

Dissertação de Mestrado

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EPIGENÉTICOS E DE REPARO DO DNA EM MODELOS EXPERIMENTAIS MURINOS DE HIPERFENILALANINEMIA

JOSÉ HENRIQUE CARARO DA SILVA



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOSÉ HENRIQUE CARARO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EPIGENÉTICOS E DE
REPARO DO DNA EM MODELOS EXPERIMENTAIS
MURINOS DE HIPERFENILALANINEMIA**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia
Fernanda Schuck.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Samira da
Silva Valvassori.

CRICIÚMA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586a Silva, José Henrique Cararo da.

Avaliação de parâmetros epigenéticos e de reparo do DNA em modelos experimentais murinos de hiperfenilalaninemia / José Henrique Cararo da Silva ; orientadora: Patrícia Fernanda Schuck ; coorientadora: Samira da Silva Valvassori. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

101 p. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

1. Hiperfenilalaninemias. 2. L-fenilalanina. 3. Epigenética. 4. Reparo do DNA. I. Título.

CDD 22. ed. 616.042



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 268

Com início às 08h00 (oito horas) do dia oito do mês de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **José Henrique Cararo da Silva**, sob a orientação da Prof.^a Dra. Patrícia Fernanda Schuck, intitulada **"AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS EPIGENÉTICOS E DE REPARO DO DNA EM MODELOS EXPERIMENTAIS MURINOS DE HIPERFENILALANINEMIA"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof.^a Dra. Vanessa Moraes de Andrade (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof.^a Dra. Gilda Angela Neves (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 09h00 (nove horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Josiane Budni Coordenadora Adjunta do Programa. Criciúma, 08 (oito) de fevereiro de 2017 (dois mil e dezessete).


Prof.^a Dra. Josiane Budni
Coordenadora Adjunta do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo as normas de Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

O presente trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (UNESC), em colaboração com o Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Terezinha e José, bem como ao meu irmão, Ezequiel, pelo árduo apoio moral e eventualmente financeiro para meus estudos, bem como em muitos outros momentos importantes de minha vida.

À professora orientadora Dr^a. Patrícia Fernanda Schuck, pelo incentivo, pela grande camaradagem, pela humildade e profissionalismo, bem como pelo esforço técnico despendido para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Gustavo da Costa Ferreira, grande profissional que me iniciou na pesquisa científica.

À professora coorientadora, Dr^a. Samira da Silva Valvassori, pela humildade e responsabilidade ao exercer brilhantemente sua profissão.

À relatora desta dissertação de mestrado, a professora Dr^a. Josiane Budni, bem como aos demais avaliadores do estudo – as professoras Dr^a. Vanessa Moraes de Andrade e Dr^a. Gilda Angela Neves.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense e seu Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, bem como à Fundação de Amparo à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina.

Aos professores do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Dr. Mauricio Reis Bogo e Dr^a. Luiza Wilges Kist.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Neurotoxicidade e Neuroproteção bem como a todos os demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração do presente trabalho.

“Uma das generalizações mais impressionantes da Bioquímica é que os vinte aminoácidos e as quatro bases nitrogenadas são, com pequenas ressalvas, os mesmos por toda a Natureza.”

Francis Crick

RESUMO

As hiperfenilalaninemias (HPA) são distúrbios hereditários do metabolismo do aminoácido L-fenilalanina (Phe), sendo causados pela deficiência da atividade da fenilalanina hidroxilase ou de enzimas envolvidas no metabolismo de sua coenzima, a tetraidrobiopterina. A HPA denominada fenilcetonúria clássica (PKU) afeta 1:10.000 recém-nascidos e é caracterizada por grave deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e transtornos psiquiátricos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da Phe sobre parâmetros epigenéticos e de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) em modelos murinos de HPA, a principal alteração bioquímica em pacientes fenilcetonúricos. Ratos Wistar machos com 5 e 30 dias de vida foram submetidos a modelos de HPA crônica (duas administrações subcutâneas diárias de Phe 5,2 $\mu\text{mol/g}$ de peso corporal e uma administração diária de *p*-clorofenilalanina 0,9 $\mu\text{mol/g}$, até o 28º dia de vida) e aguda (uma administração subcutânea de Phe 5,2 $\mu\text{mol/g}$ e *p*-clorofenilalanina 0,9 $\mu\text{mol/g}$), respectivamente. Os ratos do grupo controle foram submetidos a condições experimentais similares, exceto por receberem apenas solução de cloreto de sódio 0,9 % (peso/volume). Uma hora após a administração (HPA aguda) ou 24 horas após a última administração (HPA crônica), os animais sofreram eutanásia por decapitação e o córtex cerebral, o corpo estriado e o hipocampo foram rapidamente dissecados e limpos. Posteriormente, o DNA nuclear de cada tecido foi obtido para as avaliações epigenéticas (determinação das atividades de DNA metiltransferases, histonas acetiltransferases e histonas desacetilases). Avaliou-se também a expressão gênica das sirtuínas 1 e 6 e da enzima de reparo do DNA poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1 (PARP1). A atividade das DNA metiltransferases apresentou-se significativamente inibida no hipocampo dos animais submetidos à HPA aguda, quando comparados aos animais do grupo controle. Por outro lado, em animais recebendo Phe cronicamente, a atividade destas enzimas apresentou-se aumentada em todas as estruturas cerebrais analisadas, quando comparada àquela detectada no grupo controle. A atividade das histonas desacetilases apresentou-se aumentada em todos os tecidos cerebrais em animais submetidos à HPA aguda e crônica, quando comparados com o grupo controle. Já a atividade das histonas acetiltransferases, bem como a expressão das sirtuínas e da PARP1 não diferiram entre os grupos experimentais, independentemente da estrutura cerebral analisada e do modelo de HPA. Coletivamente, os achados do presente estudo sugerem

que os animais submetidos à HPA são sujeitos ao remodelamento da cromatina e diminuição global da expressão gênica em tecido cerebral, contribuindo para o entendimento da disfunção neurológica observada em pacientes fenilcetonúricos. Adicionalmente, este estudo propõe as histonas desacetilases e DNA metiltransferases como possíveis alvos terapêuticos para a minimização dos danos cerebrais atribuídos à PKU e parcialmente mediados por modificações epigenéticas.

Palavras-chave: Cérebro; Disfunção neurológica; Epigenética; L-Fenilalanina; Fenilcetonúria clássica.

ABSTRACT

Hyperphenylalaninemia (HPA) characterizes a group of inherited disorders of L-phenylalanine (Phe) amino acid metabolism caused by deficiency of phenylalanine hydroxylase (PAH) or enzymes involved in the metabolism of tetrahydrobiopterin, PAH coenzyme. HPA termed classic phenylketonuria (PKU) affects 1:10,000 newborns and its clinical features include severe intellectual disability, failure to thrive and psychiatric disorders. The present study aimed to evaluate the Phe effects on epigenetic and deoxyribonucleic acid (DNA) repair parameters in murine models of HPA, the main biochemical finding in PKU patients. Five- and thirty-day-old male Wistar rats were submitted to chronic (two daily subcutaneous injections of 5.2 $\mu\text{mol/g}$ body weight Phe plus one daily injection of 0.9 $\mu\text{mol/g}$ *p*-chlorophenylalanine, from 5th to 28th day of age) and acute (one subcutaneous injection of 5.2 $\mu\text{mol/g}$ Phe plus 0.9 $\mu\text{mol/g}$ *p*-chlorophenylalanine) HPA models, respectively. Control group rats were subjected to a similar experimental procedure, but received 0.9 % sodium chloride solution instead of Phe and its analogue. One hour after injection (acute HPA) or 24 hours after the last injection (chronic HPA), the animals were killed by decapitation and the cerebral cortex, striatum and hippocampus were rapidly excised and cleaned. Thereafter, nuclear DNA from each tissue was extracted in order to carry out epigenetic assays (determination of the DNA methyltransferase, histone acetyltransferase and histone deacetylase activities). Gene expression of sirtuins 1 and 6, and the DNA repair enzyme poly(adenosine-diphosphate [ADP]-ribose) polymerase 1 (PARP1) was also evaluated. DNA methyltransferase activity was significantly inhibited in hippocampus of animals submitted to acute HPA, whereas in the animals chronically receiving Phe, such enzyme activity was increased in all cerebral structures studied, as compared to control group. Histone deacetylase activity was increased in animals submitted to acute and chronic HPA, as compared to control group. On the other hand, histone acetyltransferase activity as well as sirtuins and PARP1 expressions did not differ between the experimental groups, independently on the cerebral tissue and the HPA model. Altogether, the present findings suggest that animals submitted to HPA are prone to chromatin remodeling and global decrease in cerebral gene expression, which contributes to the understanding of neurologic dysfunction observed in PKU patients. Furthermore, histone deacetylases and DNA methyltransferases are proposed as potential therapeutic targets to the

mitigation of cerebral damages associated to PKU and partly mediated by epigenetic alterations.

Keywords: Brain; Classic phenylketonuria; Epigenetics; L-Phenylalanine; Neurologic dysfunction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama que ilustra o processo de <i>para</i> -hidroxilação enzimática da L-fenilalanina.....	36
Figura 2: Esquema que ilustra genericamente os mecanismos epigenéticos que alteram a estrutura da cromatina.....	42
Figura 3: A metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA).....	44
Figura 4: Esquema geral da reação catalisada pelas sirtuínas.....	46
Figura 5: Esquema geral da reação de poli-difosfato de adenosina (ADP)-ribosilação de proteínas mediada pela poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1).....	50
Figura 6: Esquema que ilustra o delineamento experimental abordado no presente estudo.....	54
Figura 7: Níveis séricos do aminoácido fenilalanina (Phe) em ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	60
Figura 8: Níveis séricos do aminoácido fenilalanina (Phe) em ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....	60
Figura 9: Atividade de enzima ácido desoxirribonucleico metiltransferase (DNMT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	61
Figura 10: Atividade de enzima ácido desoxirribonucleico metiltransferase (DNMT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....	62
Figura 11: Atividade de enzima histona acetiltransferase (HAT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	63

Figura 12: Atividade de enzima histona acetiltransferase (HAT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....	64
Figura 13: Atividade de enzima histona desacetilase (HDAC) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	65
Figura 14: Atividade de enzima histona desacetilase (HDAC) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....	66
Figura 15: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 1 (<i>Sirt1</i>) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	67
Figura 16: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 1 (<i>Sirt1</i>) em tecidos cerebrais de animais submetidos ao modelo de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....	68
Figura 17: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 6 (<i>Sirt6</i>) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	69
Figura 18: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 6 (<i>Sirt6</i>) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....	70
Figura 19: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1 (<i>Parp1</i>) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda.....	71

Figura 20: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1 (*Parp1*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica.....72

Figura 21: Diagrama que ilustra a associação entre a exposição de células e tecidos ao acúmulo de Phe (↑ Phe) e as alterações epigenéticas capazes de interferir na expressão gênica no contexto da hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria clássica.....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP – Difosfato de adenosina (do inglês, *adenosine diphosphate*)
- AMPA – Receptor glutamatérgico do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (do inglês, *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)
- BH₄ – Tetraidrobiopterina
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês, *complementary deoxyribonucleic acid*)
- CFTR – Regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (do inglês, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)
- CoA – Coenzima A
- CpG – 5'-Citosina-fosfato-guanina-3' (do inglês, *5'-cytosine-phosphate-guanine-3'*)
- CPM – 7-Dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina (do inglês, *7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- DNMT – Ácido desoxirribonucleico metiltransferase
- DTT – Ditiotreitól
- EC – Comissão de Enzimas (do inglês, *Enzyme Commission*)
- HAT – Histona acetiltransferase
- HDAC – Histona desacetilase
- HPA – Hiperfenilalaninemia (do inglês, *hyperphenylalaninemia*)
- HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
- HR – Recombinação homóloga (do inglês, *homologous recombination*)
- NAD⁺ – Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*)
- NADH – Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido
- NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NF κ B – Fator nuclear κ B (do inglês, *nuclear factor κ B*)
- NHEJ – Junção de extremidades não homólogas (do inglês, *non-homologous end joining*)
- NMDA – Receptor glutamatérgico do tipo N-metil-D-aspartico
- OD – Densidade óptica (do inglês, *optical density*)
- OMIM – Herança Mendeliana no Ser Humano Online (do inglês, *Online Mendelian Inheritance in Man*)
- PAH – Fenilalanina hidroxilase (do inglês, *phenylalanine hydroxylase*)
- p-Cl-Phe – para-Cloro-L-fenilalanina (do inglês, *para-chloro-L-phenylalanine*)

PARP – Poli(difosfato de adenosina-ribose) polimerase
PCR – Reação em cadeia da ácido desoxirribonucleico polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
Phe – L-Fenilalanina (do inglês, *L-phenylalanine*)
PKU – Fenilcetonúria clássica (do inglês, *phenylketonuria*)
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
rpm – Rotações por minuto
SAM – S-adenosilmetionina
SIRT – Sirtuína
SNC – Sistema nervoso central
SUMO – Modificador relacionado à ubiquitina pequeno (do inglês, *small ubiquitin-related modifier*)
TNF α – Fator de necrose tumoral α (do inglês, *tumor necrosis factor α*)
UV – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	35
1.1 EPIDEMIOLOGIA	36
1.2 SINAIS E SINTOMAS	37
1.3 ACHADOS LABORATORIAIS E DIAGNÓSTICO	37
1.4 TRATAMENTO	38
1.5 FISIOPATOLOGIA	38
1.6 EPIGENÉTICA	40
1.6.1 DNMTs	42
1.6.2 HATs	44
1.6.3 HDACs	45
1.7 REPARO DO DANO AO DNA	47
1.7.1 O reparo do DNA mediado pela enzima poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1	48
1.8 JUSTIFICATIVA	50
2 OBJETIVOS	51
2.1 OBJETIVO GERAL	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 ANIMAIS	52
3.2 MODELO ANIMAL DE HPA AGUDA	52
3.3 MODELO ANIMAL DE HPA CRÔNICA	53
3.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE Phe	54
3.5 EXTRAÇÃO NUCLEAR	55
3.6 AVALIAÇÕES EPIGENÉTICAS E DE REPARO DO DANO AO DNA	56
3.6.1 Atividade das DNMTs	56
3.6.2 Atividade das HATs	56
3.6.3 Atividade das HDACs	57
3.6.4 Expressão das sirtuínas 1 e 6 e da PARP1	57
3.7 DETERMINAÇÃO DE CONTEÚDO PROTEICO	59
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	59
4. RESULTADOS	60
5. DISCUSSÃO	73

6. CONCLUSÃO82

REFERÊNCIAS83

ANEXO A98

ANEXO B100

1 INTRODUÇÃO

A deficiência da enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH; EC 1.14.16.1) é a causa de um erro inato do metabolismo do aminoácido L-fenilalanina (Phe) conhecido como fenilcetonúria clássica (PKU; OMIM 261600). Essa doença foi descrita originalmente em 1934 por Asbjørn Følling, médico norueguês, o qual denominou a condição clínica identificada em crianças com deficiência intelectual de “*imbecillitas phenylpyrouvica*” devido à quantidade anormalmente alta de fenilpiruvato presente na urina destes pacientes (Følling, 1934 apud Williams et al., 2008). No final da década de 1930, a doença em questão foi renomeada PKU (Penrose e Quastel, 1937), nomenclatura utilizada até o presente.

A enzima PAH catalisa a hidroxilação da Phe, tendo como produto da reação o aminoácido L-tirosina (Figura 1) (Flydal e Martinez, 2013). Devido ao defeito metabólico, há o acúmulo de Phe e de metabólitos secundários nos tecidos e líquidos biológicos de pacientes fenilcetonúricos, ocasionando hiperfenilalaninemia (HPA) (Blau et al., 2014). A PKU é causada por polimorfismos do gene *PAH*, o qual se localiza na região 23.2 do braço longo do cromossomo 12 (van Dijk et al., 2012). Estes polimorfismos resultam em dobramento incorreto de sua proteína correspondente, contribuindo para a desestabilização conformacional e perda da atividade enzimática (Gersting et al., 2008).

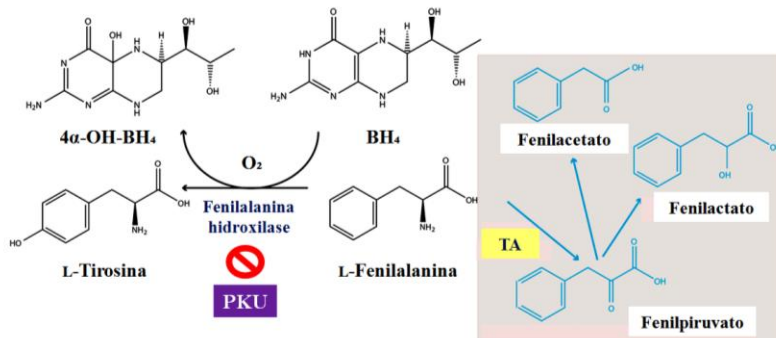


Figura 1: Diagrama que ilustra o processo de *para*-hidroxilação enzimática da L-fenilalanina. A fenilalanina hidroxilase (EC 1.14.16.1) catalisa a conversão deste aminoácido em L-tirosina na presença de oxigênio molecular (O₂) e da coenzima tetraidrobiopterina (BH₄). Na fenilcetonúria clássica (PKU), o excesso de L-fenilalanina é geralmente convertido em fenilpiruvato por transaminação (TA), ao passo que o fenilacetato e o fenilactato são metabólitos derivados do fenilpiruvato. A pterina-4α-carbinolamina (4α-OH-BH₄), composto resultante da hidroxilação da BH₄, é convertido de volta a esta coenzima para possibilitar o decurso da reação catalisada pela fenilalanina hidroxilase. Adaptado de Flydal e Martinez, 2013.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

A distribuição mundial da PKU varia conforme a etnia e a localização geográfica. Contudo, estima-se que afete um a cada 10.000 recém-nascidos (Albrecht et al., 2009). Os países com as maiores taxas de prevalência incluem a Turquia (1:2.500) (Ozalp et al., 2001), a Irlanda (1:4.500) (O'Neill et al., 1994) e a Estônia (1:6.000) (Ounap et al., 1998), enquanto que as menores taxas são observadas na Finlândia (1:100.000) (Guldberg et al., 1995), no Japão (1:115.000) (Aoki, 2003) e na Tailândia (1:223.000) (Sutivijit et al., 2011).

No Brasil, um levantamento realizado no âmbito do Programa Nacional de Triagem Neonatal nos 27 Estados brasileiros identificou uma prevalência de PKU igual a 1:25.326 recém-nascidos (de Carvalho et al., 2007). Em um levantamento anual realizado por Nunes e colegas através do Programa de Triagem Neonatal da Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina, obteve-se uma prevalência média de 1:28.862 crianças submetidas à triagem neonatal básica (Nunes et al., 2013).

1.2 SINAIS E SINTOMAS

Os indivíduos afetados por PKU, especialmente aqueles sem terapia apropriada, apresentam marcante deficiência intelectual, hipopigmentação de pele, olhos e pelos (potencialmente secundária à deficiência de L-tirosina, precursora do pigmento melanina), eczema e urina com odor murino (Casey, 2013). A deficiência de antioxidantes (Rocha e Martins, 2012) e de zinco, selênio, ferro, folato e vitamina B₁₂ (Robert et al., 2013), bem como transtornos psiquiátricos (Clacy et al., 2014; Khemir et al., 2016), sobrepeso (Rocha et al., 2013) e fragilidade óssea (Gajewska et al., 2012) podem também se manifestar em tais pacientes, ainda que tratados precocemente. Sabe-se também que a Phe é relativamente teratogênica. Níveis séricos significativamente elevados de tal aminoácido em gestantes tornam os recém-nascidos suscetíveis a deficiência psicomotora, malformações congênitas e óbito – condição denominada síndrome de PKU materna (Bókey et al., 2013).

1.3 ACHADOS LABORATORIAIS E DIAGNÓSTICO

O valor de referência estabelecido para a concentração plasmática de Phe em crianças e adultos é inferior a 2,0 miligramas por decilitro (mg/dL) (Duran, 2008). Em neonatos acometidos por PKU, este valor pode ultrapassar 3,2 mg/dL, sendo que tais pacientes podem excretar na urina fenilcetonas resultantes do metabolismo da Phe por vias metabólicas alternativas (Pitt, 2010). Okano e Nagasaka (2013) sugeriram que o nível plasmático ideal de Phe em adultos acometidos por PKU deve ser inferior a 8,0 mg/dL para o funcionamento adequado do sistema nervoso central (SNC), visto que, em níveis superiores a tal ponto de corte, estes pesquisadores demonstraram uma associação significativa com estresse oxidativo e desequilíbrio no sistema regulatório mediado por óxido nítrico no SNC destes pacientes (Okano e Nagasaka, 2013).

O diagnóstico laboratorial da PKU se inicia por testes de triagem semiquantitativos que fazem parte do Programa Nacional de Triagem Neonatal do Brasil (2001), tais como a cromatografia em papel de aminoácidos em plasma e o ensaio de inibição bacteriana de Guthrie em gotas de sangue do recém-nascido. Caso os níveis plasmáticos de Phe estejam aumentados, estes são quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). A utilização de métodos de biologia molecular para a pesquisa de alelos mutados do gene *PAH* confirma o diagnóstico de PKU (Regier e Greene, 2016).

1.4 TRATAMENTO

A dieta rigorosa restrita em Phe é ainda a base da terapia da PKU (Ney et al., 2014), contribuindo para o aumento da expectativa de vida da população afetada por tal doença (Coppus, 2013). O objetivo terapêutico da dieta em pacientes fenilcetonúricos é manter os níveis plasmáticos de Phe entre 1–6 mg/dL (Regier e Greene, 2016).

A fim de contrabalançar as limitações inerentes à dieta em relação a sabor, textura, aparência, conveniência e custo, diversas estratégias terapêuticas foram desenvolvidas. Tais abordagens incluem o fármaco análogo de BH₄ dicloridrato de sapropterina, formulações alimentícias contendo uma proteína com baixo teor de Phe denominada glicomacropeptídeo, BH₄ para pacientes responsivos e a administração de aminoácidos grandes neutros (Ney et al., 2014; Strisciuglio e Concolino, 2014; Somaraju e Merrin, 2015). Além disso, benefício clínico adicional em relação à disfunção neurológica apresentada por pacientes fenilcetonúricos foi atribuído à suplementação com o dipeptídeo L-carnitina (Ribas et al., 2014).

1.5 FISIOPATOLOGIA

Apesar da deficiência de PAH ocorrer essencialmente no fígado, o maior impacto do excesso de Phe é sobre a função e o desenvolvimento cerebrais (Donlon et al., 2008). O excesso de Phe em plasma e tecidos compromete a neurotransmissão ao provocar uma deficiência de L-3,4-di-hidroxifenilalanina, metabólito utilizado na biossíntese de catecolaminas e sintetizado a partir de L-tirosina (Sperner-Unterweger et al., 2014). Esta observação é consistente com o fato de que testes de tomografia de emissão de pósitrons envolvendo voluntários sadios e fenilcetonúricos demonstraram que o influxo cerebral do análogo 6-[¹⁸F]fluoro-L-dopamina é significativamente reduzido nestes pacientes (Landvogt et al., 2008).

A saturação do transportador de aminoácidos grandes neutros situado na barreira hematoencefálica e a diminuição da síntese proteica cerebral foram atribuídas à HPA associada à PKU (Knudsen et al., 1995; Hoeksma et al., 2009). Este achado foi relacionado ao comprometimento do transporte de grandes aminoácidos neutros para o SNC provocado por excesso de Phe (de Groot et al., 2013), bem como a uma diminuição na incorporação de L-tirosina em proteínas cerebrais (de Groot et al., 2015). Além disso, demonstrou-se que 21 proteínas são expressas anormalmente em tecido cerebral de camundongos

hiperfenilalaninêmicos homozigotos, quando comparada à expressão de camundongos heterozigotos correspondentes. Quatro destas proteínas apresentaram expressão significativamente aumentada (subunidade *Glu2/3* do receptor glutamatérgico do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico – AMPA – e a subunidade *NR1* do receptor glutamatérgico do tipo *N*-metil-D-aspartico – NMDA), enquanto que 17 proteínas apresentaram expressão reduzida, incluindo a subunidade B da creatina cinase (EC 2.7.3.2), proteína 2 relacionada à di-hidropirimidinase (EC 3.5.2.2), fosfopiruvato hidratase (EC 4.2.1.11), fosfoglicerato mutase 1 (EC 5.4.2.11), isoforma M2 da piruvato cinase (EC 2.7.1.40) e sinapsina II (Imperlini et al., 2014).

Adicionalmente, o estresse oxidativo tem sido largamente descrito em modelos animais de HPA e PKU (Fernandes et al., 2010; Mazzola et al., 2011; He et al., 2014; Moraes et al., 2014) e em pacientes fenilcetonúricos (Sitta et al., 2009a, 2011; Huemer et al., 2012). Nesse sentido, níveis aumentados de Phe e seus metabólitos podem comprometer a biossíntese de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9), indicando um efeito do acúmulo de Phe sobre a síntese proteica potencialmente relacionado ao estresse oxidativo (Rocha e Martins, 2012). Ercal e colaboradores (2002) demonstraram que os níveis cerebrais e eritrocitários de malondialdeído, um produto de peroxidação lipídica, bem como a atividade de enzimas antioxidantes eritrocitárias foram significativamente aumentados em camundongos hiperfenilalaninêmicos *Pah*^{enu2-BTBR} PKU com 14 a 24 semanas de vida. A mutação presente nesta linhagem pode ser induzida quimicamente pela substituição de timina por citosina no éxon 7 do gene *Pah*, resultando, por conseguinte, na substituição de um resíduo de Phe (*Phe* 263) por serina (McDonald e Charlton, 1997).

Estudos identificaram também um envolvimento potencial de estresse oxidativo em células cultivadas em meio enriquecido com Phe (Lu et al., 2011). A enzima fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH) desidrogenase (EC 1.6.5.10) é considerada relevante no equilíbrio redutor celular por influenciar nos níveis de NADPH, sendo sua expressão e atividade significativamente aumentadas em células mononucleares de camundongos *Pah*^{enu2-BTBR} PKU, em comparação com camundongos selvagens (He et al., 2013), indicando que uma diminuição relativa dos níveis de NADPH pode estar envolvida no mecanismo de estresse oxidativo associado à PKU.

Ainda, uma inibição das atividades das enzimas apirase (EC 3.6.1.5) e creatina cinase (EC 2.7.3.2) *in vitro* e a ativação de vias apoptóticas foram demonstradas em neurônios corticais cultivados em meio

enriquecido com Phe (Berti et al., 2001; Costabeber et al., 2003; Zhang et al., 2007; Huang et al., 2013). Além disso, alterações no metabolismo energético foram implicadas na fisiopatologia da PKU (Berti et al., 2012). Neste contexto, demonstrou-se que a neurotoxicidade induzida por altas concentrações de Phe está associada a uma diminuição significativa na atividade da adenilato cinase (EC 2.7.4.3) e de isoformas de creatina cinase em hipocampo e córtex cerebral de ratos (Bortoluzzi et al., 2014), potencialmente contribuindo para o entendimento da disfunção neurológica observada em pacientes com PKU.

Adicionadas a estes achados, alterações em oligodendrócitos, células mielinizantes do SNC essenciais para a transmissão dos potenciais de ação neuronais, são encontradas em situações de estresse oxidativo (El Waly et al., 2014). Esta característica, assim como a diminuição da síntese proteica cerebral supracitada, pode colaborar para o processo de hipomielinização detectado em pacientes acometidos por PKU (Gourovitch et al., 1994; Zhongshu et al., 2001; Anderson e Leuzzi, 2010). Demais alterações relacionadas à fisiopatologia deste distúrbio incluem a formação de fibrilas de Phe como consequência da autoagregação deste aminoácido acumulado em concentrações milimolares, conforme demonstrado em estudos *in vitro* e em tecido cerebral de camundongos *Pah^{enu2}* e pacientes fenilcetonúricos obtido *post mortem* (Adler-Abramovich et al., 2012). A citotoxicidade destas estruturas supramoleculares foi expressa em termos de diminuição da viabilidade celular em células incubadas em um meio saturado com Phe (20 mM), a qual foi neutralizada pela administração de anticorpos anti-Phe específicos (de Luigi et al., 2015).

Alterações epigenéticas como a metilação do DNA também foram detectadas em tecido cerebral de camundongos transgênicos com HPA (Dobrowolski et al., 2016) e pacientes fenilcetonúricos (Dobrowolski et al., 2015). Além disso, o dano ao DNA foi detectado em leucócitos destes pacientes (Sitta et al., 2009b; Deon et al., 2015), bem como em cérebro e leucócitos de ratos submetidos à HPA (Simon et al., 2013), indicando que o reparo do dano induzido contra esta macromolécula pode ser defeituoso na PKU.

1.6 EPIGENÉTICA

O termo epigenética (do grego *epi*, sobre + “genética”) foi cunhado por Conrad Waddington (1942) e pode ser definido como o conjunto de mecanismos que levam a modificações funcionais do genoma ao induzir

alterações estáveis na expressão gênica, sem que haja alterações na sequência de nucleotídeos de ácido desoxirribonucleico (DNA) que compõe o gene (Nieratschker et al., 2013). Câncer, transtornos mentais e doenças reprodutivas e autoimunes são algumas condições clínicas relacionadas a alterações epigenéticas, enquanto que a exposição a metais pesados e pesticidas, radiação, tabagismo, hormônios, micro-organismos e certos nutrientes são considerados agentes desencadeadores deste processo (Weinhold, 2006).

Cada molécula de DNA é compartimentalizada no núcleo de uma célula eucariótica em uma estrutura denominada cromatina. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, o qual é composto por um octâmero de histonas (duas cópias de cada uma das quatro histonas – H2A, H2B, H3 e H4) circundado por uma sequência de DNA de aproximadamente 147 pares de bases nitrogenadas. As histonas são proteínas globulares, mas apresentam cadeias N-terminais que se projetam do nucleossomo e cuja extremidade é sujeita a modificações covalentes (Kouzarides, 2007). A expressão gênica é regulada epigeneticamente por metilação e 5-hidroximetilação do DNA e modificações covalentes de histonas, as quais levam a alterações conformacionais de cromatina (incluindo metilação, acetilação, ubiquitinação e SUMOilação de histonas) (Bannister e Kouzarides, 2011; Nieratschker et al., 2013; Sheng et al., 2014) (Figura 2). Além disso, a interferência mediada por ácido ribonucleico (RNA) de sequência curta e longa, não codificante, também contribui para a regulação deste processo (Stefanska e MacEwan, 2015). A metilação de histonas é regulada dinamicamente por histonas metiltransferases (EC 2.1.1.43) e desmetilases (EC 1.14.11.27) (Burchfield et al., 2015). Outras enzimas epigenéticas incluem as DNA metiltransferases (DNMTs; EC 2.1.1.37), as histonas acetiltransferases (HATs; EC 2.3.1.48) e as histonas desacetilases (HDACs; EC 3.5.1.98) (Arrowsmith et al., 2012).

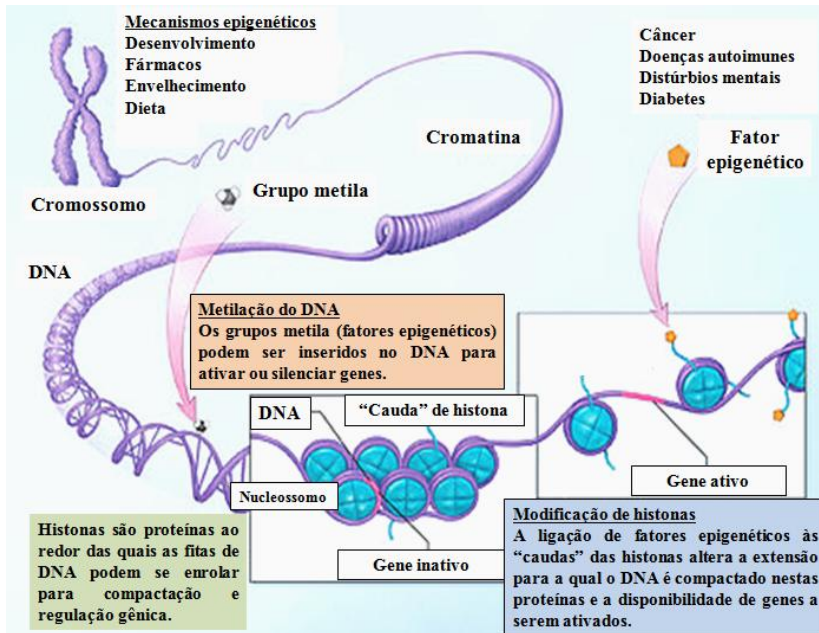


Figura 2: Esquema que ilustra genericamente os mecanismos epigenéticos que alteram a estrutura da cromatina. A metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA) está associada ao desenvolvimento embrionário e fetal, uso de fármacos, envelhecimento e a certos componentes da dieta. Por outro lado, a modificação de histonas, que consiste na ligação covalente de fatores epigenéticos nas extremidades das cadeias N-terminais ("caudas") destas proteínas, pode ser induzida por câncer, doenças autoimunes, distúrbios mentais e diabetes. O resultado destes mecanismos contribui positiva ou negativamente para a exposição de sequências de DNA que compõem determinados genes. Adaptado de *National Institutes of Health* (2011).

1.6.1 DNMTs

A metilação do DNA, mais especificamente a ligação de grupos metila ao carbono 5' de resíduos de citosina desta macromolécula, é um mecanismo epigenético comum em eucariotos, sobretudo quando envolve regiões do genoma de células somáticas densamente constituídas por dinucleotídeos 5'-citosina-fosfato-guanina-3' denominadas ilhas CpG (do inglês, 5'-cytosine-phosphate-guanine-3') (Laird, 2010). Contudo, em células-tronco pluripotentes, este mecanismo epigenético pode envolver sítios diferentes dos dinucleotídeos de citosina e guanina (Lister et al., 2009) e foi implicado

em diversos contextos biológicos, incluindo desde o processo de desenvolvimento normal (Law e Jacobsen, 2010; Ghayor e Weber, 2016) até a manutenção de memórias (Day e Sweatt, 2010). A metilação em regiões adjacentes às sequências de DNA que compõem os genes (promotores) é associada ao silenciamento da transcrição gênica (Jin et al., 2011).

A metilação do DNA é mediada pelas DNMTs, enzimas nucleares que catalisam a transferência de um grupo metila do substrato *S*-adenosilmetionina (SAM) para um resíduo de citosina. Cinco membros desta classe de enzimas foram identificados em mamíferos: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L. A DNMT1, DNMT3a e DNMT3b interagem para produzir o padrão global de metilação do DNA envolvendo resíduos de citosina (Kulis e Esteller, 2010). Destas três isoformas, a DNMT1 está presente em praticamente todas as células eucarióticas e é responsável pela manutenção da metilação, enquanto que os demais membros são relacionados à metilação *de novo* nestes mesmos tipos celulares em diversas condições fisiológicas (Yamagata et al., 2012) (Figura 3). Adicionalmente, a metilação de DNA e a metilação de histonas se influenciam mutuamente, de modo que a metilação do DNA pode auxiliar no recrutamento e na modificação de histonas após a replicação celular, enquanto que a metilação de histonas pode determinar padrões de metilação do DNA (Cedar e Bergman, 2009).

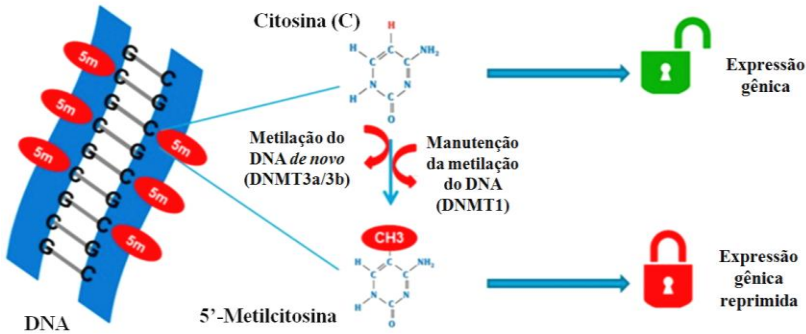


Figura 3: A metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Este mecanismo é catalisado pelas DNA metiltransferases (DNMTs) e ocorre geralmente em resíduos de bases de citosina (C) nas ilhas 5'-citosina-fosfato-guanina-3' (CpG), quando um grupo metila é ligado ao carbono 5' do anel pirimidínico. A DNMT3a e a DNMT3b medeiam a metilação de resíduos de citosina previamente não metilados (metilação *de novo*), enquanto que a DNMT1 é responsável pela metilação de DNA hemimetilado (metilado na sequência complementar). O silenciamento da expressão gênica pode ser desencadeado pela ligação de um grupo metila à sequência de DNA correspondente ao promotor de um gene. Adaptada de Ghayor e Weber (2016).

1.6.2 HATs

A acetilação de grupos ϵ -amino de resíduos de lisina presentes nas extremidades das cadeias N-terminais das histonas é responsável por neutralizar a carga positiva destes grupos, contribuindo para a diminuição da interação eletrostática entre as histonas e o DNA e, por conseguinte, tornando esta molécula acessível para a transcrição gênica (Horikoshi, 2013). A acetilação de histonas regula a montagem dos nucleossomos, a condensação e o dobramento da cromatina, assim como o silenciamento da heterocromatina. Para ilustrar, a acetilação do resíduo de lisina 16 da histona H4 limita significativamente a compactação da cromatina, bem como reduz a interação entre as fibras de nucleossomos (Shahbazian e Grunstein, 2007). Modificações covalentes como a acetilação de histonas são um dos eventos moleculares que contribuem para a alteração estrutural da cromatina (Choi e Howe, 2009).

As HATs medeiam a acetilação de histonas ao utilizar a acetil-coenzima A (acetil-CoA) como substrato doador do grupo acetila

($-\text{COCH}_3$), catalisando a ligação deste a resíduos de lisina presentes nas extremidades das cadeias que se projetam das histonas (Sun et al., 2012). Consequentemente, as HATs são recrutadas para promotores de genes, a fim de possibilitar sua transcrição (Judes et al., 2015). A maioria das HATs nucleares de mamíferos pode ser classificada em pelo menos três famílias, de acordo com a homologia de suas sequências: *i*) a família de *N*-acetiltransferases, relacionadas ao controle geral da síntese de aminoácidos, sendo constituída pelas lisinas acetiltransferases 2A e 2B; *ii*) a família *MYST* (sigla inglesa formada a partir dos nomes de seus quatro membros fundadores – *MOZ*, *YBF2/SAS3*, *SAS2* e *TIP60*), composta pelas lisinas acetiltransferases 5, 6A, 6B, 7 e 8; *iii*) e a família da proteína ligante p300/ligante da proteína ligante de elemento de resposta ao monofosfato de adenosina cíclico é constituída pelas lisinas acetiltransferases 3A e 3B (van Beekum e Kalkhoven, 2007; Wapenaar e Dekker, 2016). A diminuição global da acetilação de histonas detectada no câncer pode ser atribuída à diminuição da atividade das HATs (Su et al., 2016). Além disso, algumas destas enzimas são inibidas *in vitro* na presença de compostos como o ácido anacárdico (Eliseeva et al., 2007).

1.6.3 HDACs

As HDACs catalisam a remoção dos grupos acetila ligados a resíduos de lisina presentes nas histonas, contribuindo para a condensação da cromatina e o silenciamento da transcrição gênica (Zhang et al., 2015). Em humanos, as 18 HDACs conhecidas são agrupadas em quatro classes: a classe I inclui as HDAC1-3 e HDAC8; a classe II inclui as HDAC4-7 e HDAC9 (subclasse IIa), bem como a HDAC6 e HDAC10 (subclasse IIb); a classe III é composta pelas sete sirtuínas (SIRT1-7) – HDACs implicadas no envelhecimento, sobrevivência e metabolismo que utilizam dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NAD^+) como coenzima (Figura 4); e a classe IV é constituída por um único membro, a HDAC11 (Li e Seto, 2016). Com exceção das sirtuínas, as HDACs são inibidas significativamente na presença de ácido *n*-bútrico ou seu sal sódico, ácido valproico e o agente antifúngico tricostatina A (Fortson et al., 2011; Steliou et al., 2012; Paino et al., 2014).

As HDACs influenciam diversas funções celulares, incluindo a via de sinalização da insulina (Sharma e Taliyan, 2016) e a estabilidade do genoma (Gong et al., 2016). A HDAC4 apresenta atividade desacetilase praticamente indetectável. Contudo, esta isoforma foi associada com a regulação da SUMOilação de proteínas e a transcrição gênica

envolvidas na manutenção de funções cognitivas (Wu et al., 2016). Além disso, padrões de expressão anormais das HDACs de classe I, II e IV foram detectados em certos tipos de câncer, tais como as enfermidades malignas hematológicas (Li e Seto, 2016).

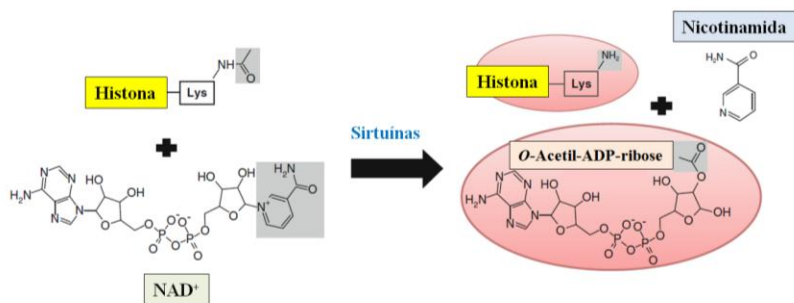


Figura 4: Esquema geral da reação catalisada pelas sirtuínas. Estas isoformas de histonas desacetilases utilizam a coenzima dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD^+) como aceptor do grupo acetila ($-\text{COCH}_3$, destacado em cinza) ligado a grupos ϵ -amino ($-\text{NH}_2$) de resíduos de lisina (Lys) em histonas. Os produtos desta reação são a histona desacetilada, nicotinamida e *O*-acetil-difosfato de adenosina (ADP)-ribose. Adaptada de Rahnasto-Rilla e colaboradores (2016).

As sirtuínas são consideradas mediadores de longevidade evolutivamente conservados, sendo ativadas em condições de estresse, tais como a restrição calórica (Guarente, 2013). Estas proteínas são expressas em todos os tecidos humanos. A sirtuína nuclear SIRT1, por exemplo, é expressa em cérebro, fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculos esquelético e cardíaco. A SIRT1 e a isoforma mitocondrial SIRT3 possuem papel essencial na homeostase energética de mamíferos (Nogueiras et al., 2012). Nesse sentido, a SIRT1 desacetila e ativa diversos fatores de transcrição envolvidos em resposta de estresse celular, bem como atua diretamente sobre proteínas do metabolismo (Guarente, 2007). Para ilustrar, no fígado, a SIRT1 inibe a lipogênese, estimula a β -oxidação de ácidos graxos e regula os níveis de ácidos biliares e colesterol (Kemper et al., 2013), o que contribui para o entendimento da esteatose hepática relacionada ao etilismo, uma vez que o excesso de etanol diminui a expressão hepática desta sirtuína (You et al. 2015). Além disso, a SIRT1 está envolvida com a regulação do ciclo celular e sua expressão é normalmente aumentada a fim de sustentar a proliferação de certos tipos de câncer (Grbesa et al., 2015).

A SIRT6, por sua vez, é uma sirtuína nuclear que interage com proteínas envolvidas na regulação da transcrição gênica, organização da cromatina, transporte nuclear, atividade da telomerase (EC 2.7.7.49) e processamento de RNA (Miteva e Cristea, 2014). A presença desta sirtuína no SNC foi associada à regulação do processo de desenvolvimento somático e pode prevenir o aparecimento de obesidade, conforme estudos realizados em camundongos transgênicos $BS6^{ko}$, os quais apresentam deleção do gene *Sirt6* em tecido cerebral (Schwer et al., 2010). Nesta região, a SIRT6 é altamente expressa em neurônios corticais e hipocâmpais, bem como em frações de membrana sinaptosomal, potencialmente contribuindo para regular a função sináptica, a maturação e a sobrevivência neuronais (Cardinale et al., 2014). Adicionalmente, a atividade desta sirtuína é necessária para a regulação da secreção de insulina pelas células β -pancreáticas, em parte por influenciar nos níveis de Ca^{2+} (Xiong et al., 2016). Outra função atribuída à atividade desacetilase da SIRT6 é a inibição da expressão do fator nuclear κB (NF κB), um fator de transcrição envolvido na ativação de genes de resposta inflamatória (Yu et al., 2013). Este mecanismo foi demonstrado em diferentes cenários patológicos (Lappas, 2012; Balestrieri et al., 2015; Maksin-Matveev et al., 2015; Thandavarayan et al., 2015; Wu et al., 2015) e pode ser desencadeado pela ativação do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Lee et al., 2013).

1.7 REPARO DO DANO AO DNA

As células são constantemente expostas a estímulos estressantes, sejam eles endógenos ou ambientais, os quais podem modificar as macromoléculas biológicas. Neste contexto, fatores como radiação, espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio, agentes alquilantes e produtos resultantes de peroxidação lipídica podem alterar a estrutura do DNA. O reparo dos danos induzidos contra esta molécula é, por conseguinte, crucial para a estabilidade e a integridade da informação contida no genoma (Schmoll et al., 2016). Defeitos no processo de reparo do DNA tornam os humanos suscetíveis a diversas condições patológicas, incluindo o câncer (Couto et al., 2013). Paradoxalmente, em certos tipos de tumor, como o melanoma maligno, há um aumento anormal da expressão de genes implicados nas vias de reparo do DNA (Sarasin e Dessen, 2010). Estas vias são parte do processo de resposta celular ao dano ao DNA e incluem o reparo direto, o reparo por excisão de base nitrogenada, o reparo por excisão de nucleotídeo e o reparo do

pareamento incorreto de bases e da quebra da dupla hélice de DNA (Gavande et al., 2016).

Dentre estes, o mecanismo mais simples é o reparo direto, que não envolve excisão de bases ou ruptura da cadeia de pentose-fosfato, consistindo de reações enzimáticas que podem remover lesões induzidas por agentes alquilantes e radiação ultravioleta (UV) (Eker et al., 2009). O reparo direto pode ser subdividido em duas vias: reparo do dano induzido por agentes alquilantes, o qual é mediado por DNA alquiltransferases (EC 2.1.1.63) e DNA dioxigenases (EC 1.14.11.33), e o reparo de lesões induzidas por radiação UV, mediado por DNA fotoproducto-liases (EC 4.1.99.14) e DNA fotoliasas (EC 4.1.99.13) (Eker et al., 2009). As vias de reparo por excisão de base são responsáveis pela remoção de bases modificadas por alquilação, desaminação, oxidação, entre outras reações (Robertson et al., 2009). Já o reparo por excisão de nucleotídeo remove adutos do DNA (os quais podem ser causados por radiação UV) e contribui para o reparo de ligações cruzadas que ocorrem em uma ou entre duas cadeias de DNA. O reparo por pareamento incorreto de base corrige erros resultantes da incorporação de nucleotídeos inseridos e pareados incorretamente durante a replicação, bem como deleções e inserções de nucleotídeos (Curtin, 2012). De acordo com Pardo e colaboradores (2009), o reparo de quebras da dupla hélice de DNA pode ocorrer principalmente por duas vias: pela junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e por recombinação homóloga (HR). A NHEJ medeia o reparo do DNA por religar as duas extremidades formadas pela quebra. A HR, por sua vez, consiste de trocas de sequências idênticas entre a molécula de DNA apresentando a quebra e outra molécula de DNA intacta. Geralmente, a HR é um mecanismo isento de erros quando a sequência de DNA que serve de molde para o reparo é idêntica à sequência que apresenta quebra (Pardo et al., 2009).

1.7.1 O reparo do DNA mediado pela enzima poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1

As quebras de cadeias simples de DNA que ocorrem continuamente podem ser reparadas por excisão de bases e nucleotídeos, bem como pelo reparo do pareamento incorreto de bases utilizando uma sequência de DNA intacta e idêntica à sequência apresentando a lesão. O mecanismo predominante de reparo de danos em cadeias simples é pela excisão de bases, via que inclui uma família de enzimas denominadas poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerases (PARP; EC

2.4.2.30) (Davar et al., 2012). Estas enzimas também estão relacionadas à transcrição gênica e a modificações da estrutura da cromatina (Morales et al., 2014). Em humanos, existem ao menos 17 isoformas de PARP, cuja maioria consiste de proteínas citoplasmáticas, enquanto que PARP1 e PARP2 são isoformas nucleares (Vyas et al., 2013).

A PARP1 catalisa a poli-ADP-ribosilação de diversas proteínas e de si mesma na presença da coenzima NAD^+ (Ogino et al., 2010). Logo após a ruptura de uma cadeia simples de DNA, a PARP1 se liga ao sítio da lesão através de seus domínios de zinco e utiliza a porção ADP-ribose presente em cada molécula de NAD^+ , a fim de sintetizar cadeias de oligo- ou poli-ADP-ribose. Estas cadeias se ligam covalentemente a proteínas específicas, processo que leva à descondensação da cromatina e ao recrutamento de enzimas de reparo no sítio da lesão (Figura 5) (Malyuchenko et al., 2015). A expressão do gene relacionado à PARP1 humana (*PARP1*) é homogênea e relativamente baixa na maioria dos tecidos normais, embora possa ser anormalmente elevada em diversas neoplasias, incluindo câncer de mama, útero, ovário, pulmão e colorretal (Ossovska et al., 2010; Sulzyc-Bielicka et al., 2012). Consistentemente, a inibição desta enzima resulta em atividade antitumoral contra certos tipos de câncer, possivelmente por defeitos no processo de reparo do DNA presentes nestes tecidos (Mateo et al., 2015). Este é o caso dos tumores de mama que apresentam alelos mutados de um gene supressor de tumor, o gene do câncer de mama 1 (*BRCA1*), os quais apresentam defeitos na via de reparo por recombinação homóloga, indicando que a expressão da PARP1 pode estar aumentada a fim de contrabalançar as alterações no reparo do DNA causadas pela deficiência desta via (Green et al., 2015).

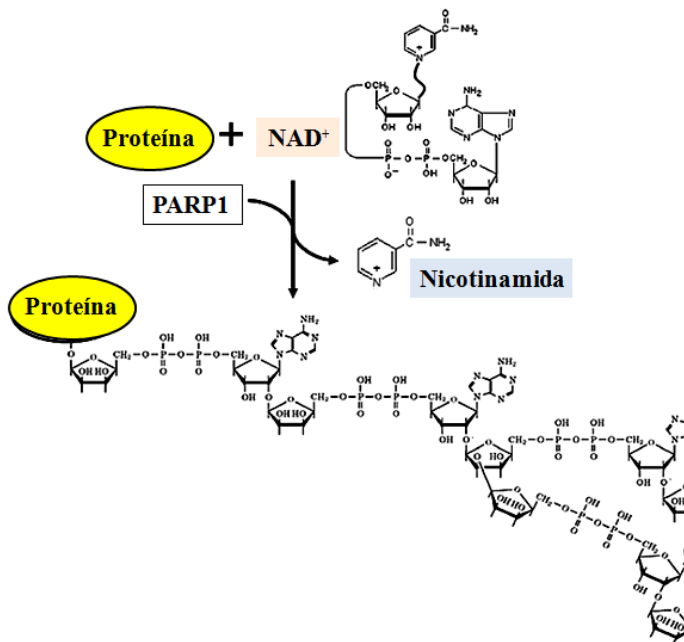


Figura 5: Esquema geral da reação de poli-difosfato de adenosina (ADP)-ribosilação de proteínas mediada pela poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1; EC 2.4.2.30). Esta enzima catalisa a poli-ADP-ribosilação de proteínas na presença da coenzima dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidada (NAD⁺). Após a quebra de uma cadeia simples de ácido desoxirribonucleico (DNA), a PARP1 se liga ao sítio da lesão e utiliza o grupo ADP-ribose de cada molécula de NAD⁺ a fim de sintetizar cadeias de oligo- ou poli-ADP-ribose, as quais se ligam covalentemente a proteínas. O resultado final deste processo é o recrutamento de enzimas de reparo no local da lesão. Adaptada de Malyuchenko e colaboradores (2015).

1.8 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral apresentado por pacientes fenilcetonúricos ainda não estão completamente estabelecidos e que achados recentes sugerem o envolvimento de alterações epigenéticas e dano ao DNA na fisiopatologia da PKU, torna-se importante avaliar o possível papel da Phe nessas alterações. O conhecimento da fisiopatologia da doença pode colaborar para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a PKU.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de altas concentrações de Phe sobre parâmetros epigenéticos e de reparo do DNA em modelos experimentais murinos de HPA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas DNMTs em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de ratos submetidos a modelos experimentais de HPA aguda e crônica;
- Determinar a atividade das enzimas HATs em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de ratos submetidos a modelos experimentais de HPA aguda e crônica;
- Determinar a atividade das enzimas HDACs em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de ratos submetidos a modelos experimentais de HPA aguda e crônica;
- Analisar a expressão dos genes *Sirt1* e *Sirt6* em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de animais submetidos a modelos experimentais de HPA aguda e crônica;
- Avaliar a expressão do gene *Parp1* em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de animais submetidos a modelos experimentais de HPA aguda e crônica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, com 5 (HPA crônica) e 30 dias de vida (HPA aguda) e provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de 22 ± 1 °C e com exaustão. Os ratos tiveram livre acesso à água e à ração comercial específica. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Universidade (protocolos N^{os} 66/2012 e AD-66/2012, anexos A e B, respectivamente) e obedeceu a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal n° 465 de 23 de maio de 2013 (Brasil, 2013).

O número de animais por grupo experimental foi igual a 5–6. Considerando-se a quantidade de tecido necessária para a realização de todos os experimentos do presente estudo, o número total de animais utilizado foi de 62.

3.2 MODELO ANIMAL DE HPA AGUDA

Inicialmente, os ratos com 30 dias de vida foram divididos em 2 grupos experimentais: grupo controle ($n = 6$) e grupo HPA ($n = 6$). Os animais do grupo HPA receberam uma única administração subcutânea de Phe ($5,2 \mu\text{mol/g}$ de peso corporal) e *para*-cloro-L-fenilalanina (*p*-Cl-Phe; $0,9 \mu\text{mol/g}$), este último um inibidor da enzima PAH. Os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl 0,9 % p/v) nas mesmas condições experimentais (Wyse et al., 1995). Uma hora após a administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina, sem anestesia. A caixa craniana foi aberta e o conteúdo cerebral foi retirado e rapidamente dissecado em uma placa de Petri mantida em gelo. O córtex cerebral foi isolado das estruturas subcorticais e da massa branca. Posteriormente, o corpo estriado e o hipocampo foram extraídos e as estruturas cerebrais foram limpas e mantidas a -80 °C até o momento das análises (Figura 6). Amostras de sangue periférico total também foram coletadas para obtenção de soro

por centrifugação a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos.

3.3 MODELO ANIMAL DE HPA CRÔNICA

Animais com 5 dias de vida foram divididos em 2 grupos experimentais: grupo controle ($n = 5$) e grupo HP A ($n = 5$). Os animais do grupo HPA receberam duas administrações subcutâneas diárias de Phe ($5,2 \mu\text{mol/g}$), com intervalo de 12 h entre cada administração, e uma administração diária subcutânea de *p*-Cl-Phe ($0,9 \mu\text{mol/g}$) do quinto ao vigésimo oitavo dia de vida. Os animais do grupo controle receberam solução salina nas mesmas condições (Wyse et al., 1995). Todos os animais foram mantidos com suas respectivas mães até o vigésimo primeiro dia de vida, período este para lactação. Vinte e quatro horas após a última administração, os animais sofreram eutanásia por decapitação com guilhotina sem anestesia, a caixa craniana foi aberta e o conteúdo cerebral foi retirado e rapidamente dissecado em uma placa de Petri mantida em gelo. O córtex cerebral foi isolado das estruturas subcorticais e da massa branca. Posteriormente, o corpo estriado e o hipocampo foram extraídos e as estruturas cerebrais foram limpas e mantidas a -80°C até o momento das análises. Amostras de sangue periférico total também foram coletadas para obtenção de soro através de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos (Figura 6).

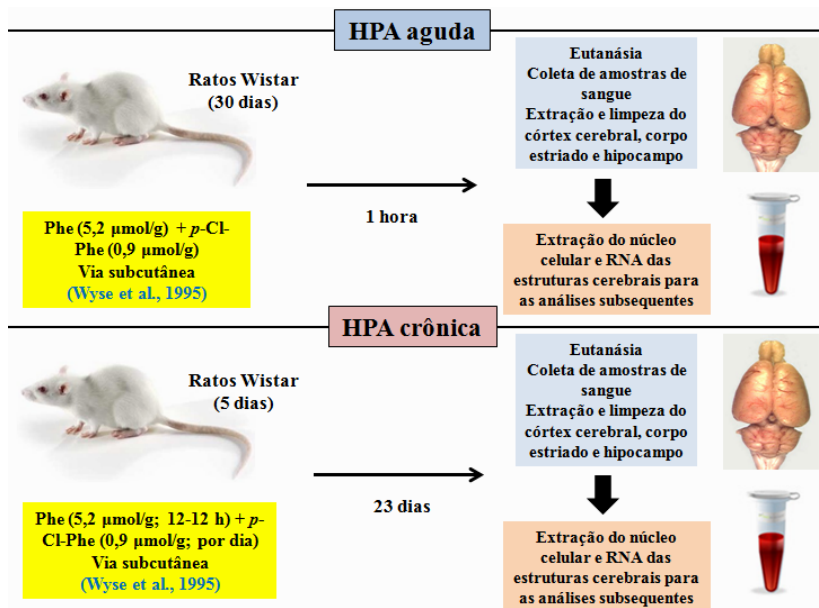


Figura 6: Esquema que ilustra o delineamento experimental abordado no presente estudo. O modelo murino de hiperfenilalaninemia (HPA) induzida quimicamente foi desenvolvido e padronizado por Wyse e colaboradores (1995). DNA: Ácido desoxirribonucleico; Phe: L-Fenilalanina; *p*-Cl-Phe: *para*-Cloro-L-fenilalanina; RNA: Ácido ribonucleico.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE Phe

A determinação dos níveis séricos de Phe foi realizada utilizando-se kit comercial específico (*Phenylalanine Assay Kit*, Item MAK005; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). A concentração deste aminoácido foi determinada por ensaio ligado à enzima, no qual ocorre a produção de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) acoplada à desaminação da Phe presente em cada amostra. Ao final do ensaio, um composto é formado a partir do NADH, cuja fluorescência pode ser mensurada em espectrofotômetro de microplaca em comprimento de onda (λ) de excitação de 535 nm e emissão de 587 nm. Os níveis de Phe são proporcionais à intensidade da densidade óptica (OD) medida e foram expressos em mg/mL.

3.5 EXTRAÇÃO NUCLEAR

A extração nuclear foi realizada utilizando-se um kit comercial específico (*Nuclear Extraction Kit*, Item 10009277; Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos). Inicialmente, as amostras de tecido foram transferidas para tubos previamente resfriados. A estes tubos adicionou-se o tampão hipotônico completo (produzido conforme as instruções do fabricante do produto) suplementado com ditioneitol (DTT) e Nonidet P-40[®] (3 µL de DTT 1 M e 3 µL de Nonidet P-40[®] 10 % por grama de tecido) na proporção de 3 mL de tampão suplementado por grama de tecido. Cada amostra foi homogeneizada em seu respectivo tubo e incubada em gelo por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação em microcentrífuga a $300 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido em cada tubo continha a fração citosólica, a qual foi transferida para tubos previamente resfriados e mantida em gelo. Neste estágio do procedimento, a maior parte das células do sedimento obtidas na etapa anterior ainda não foram lisadas. Por conseguinte, o sedimento contido em cada tubo foi gentilmente homogeneizado em tampão hipotônico completo. Os tubos com a suspensão obtida foram então incubados em gelo por 15 minutos. Decorrido este tempo, adicionaram-se 50 µL de Nonidet P-40[®] 10 % a cada tubo e procedeu-se a homogeneização por pipetagem para cima e para baixo. Posteriormente, os tubos foram submetidos à centrifugação a $14.000 \times g$ por 30 segundos a 4 °C e o sobrenadante obtido foi transferido para o tubo contendo a fração citosólica e armazenado a -80 °C. O sedimento obtido foi homogeneizado em tampão de extração nuclear completo (produzido conforme as instruções do fabricante). A suspensão gerada foi homogeneizada vigorosamente em agitador de tubos por 15 segundos e, então, incubada em gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente homogeneizados em agitador por 30 segundos e incubados em gelo por 15 minutos adicionais. Finalmente, as amostras foram submetidas à centrifugação a $14.000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes continham a fração nuclear e foram transferidos para tubos resfriados e armazenados a -80 °C para as análises subsequentes. Uma alíquota desta suspensão foi previamente transferida para tubos resfriados para a quantificação de proteínas e armazenada a -80 °C.

3.6 AVALIAÇÕES EPIGENÉTICAS E DE REPARO DO DANO AO DNA

3.6.1 Atividade das DNMTs

A atividade das DNMTs foi determinada a partir de um kit comercial específico (*Methyltransferase Fluorometric Assay Kit*, Item 700150; Cayman Chemical), utilizado para se mensurar a atividade de enzimas metiltransferases dependentes da coenzima SAM (EC 2.1.1). Durante o procedimento, a remoção de um grupo metila da SAM produz a *S*-adenosil-homocisteína, a qual é imediatamente convertida em *S*-ribosil-homocisteína e adenina pela atividade da enzima *S*-adenosil-homocisteína nucleosidase (EC 3.2.2.9). Finalmente, a adenina é convertida a hipoxantina e esta, por sua vez, é convertida em urato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação entre H_2O_2 e o composto 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina do kit produz um composto denominado resorufina, cuja fluorescência pode ser analisada em um fluorímetro de microplaca em λ de excitação e emissão de 530–540 nm e 585–595 nm, respectivamente. A atividade das DNMTs é proporcional à intensidade da OD medida e foi expressa em OD . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹. A *S*-adenosil-homocisteína pode ser utilizada como controle positivo do ensaio.

3.6.2 Atividade das HATs

A atividade das HATs foi avaliada por meio de um kit comercial específico (*HAT Inhibitor Screening Assay Kit*, Item 10006515; Cayman Chemical). Resumidamente, este procedimento necessita de apenas três etapas simples. No primeiro passo, as HATs derivadas das amostras são incubadas com acetil-CoA e com um peptídeo de histona H3. Neste momento, as HATs catalisam a transferência enzimática de grupos acetil do acetil-CoA ao peptídeo de H3, produzindo um peptídeo acetilado e coenzima A (CoA-SH). Após a adição de isopropanol para interromper a reação enzimática (passo 2), um composto denominado 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina (CPM) é adicionado aos poços da placa (passo 3). O CPM reage com os grupos tióis livres presentes nas moléculas de CoA-SH, formando um produto altamente fluorescente que é detectado usando-se λ de excitação e emissão de 360–390 nm e 450–470 nm, respectivamente. Esta informação foi utilizada para calcular a atividade das HATs presentes nas amostras, a qual foi expressa em OD . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

3.6.3 Atividade das HDACs

A atividade das HDACs foi avaliada através de um kit comercial específico (*Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit (Colorimetric)*, Item P-4034-96; Epigentek, Farmingdale, Nova Iorque, Estados Unidos). Este kit continha os reagentes necessários para se determinar a atividade destas enzimas, incluindo uma histona acetilada que reveste firmemente as paredes internas dos poços da microplaca. As HDACs presentes na amostra se ligam a este substrato e catalisam a clivagem das ligações que unem os grupos acetila à histona. Os produtos desacetilados desta reação podem ser reconhecidos por um anticorpo específico. A quantidade de produto desacetilado detectada, proporcional à atividade enzimática, foi determinada colorimetricamente pela leitura da absorvância em espectrofotômetro de microplaca a $\lambda = 450$ nm. A atividade das HDACs, proporcional à intensidade da OD medida, foi expressa em $OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

3.6.4 Expressão das sirtuínas 1 e 6 e da PARP1

O RNA total foi isolado do córtex pré-frontal, do hipocampo e do corpo estriado utilizando-se uma solução composta por tiocianato de guanidina e fenol comercialmente conhecida como *TRIzol®* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante. A pureza (absorvância 260/280 nm) e a concentração de RNA foram determinadas pelo quantificador de RNA/DNA L-quant (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μg do RNA total utilizando-se o sistema de transcrição reversa *ImProm-II™* (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo as instruções do fabricante. A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR; EC 2.7.7.7) quantitativa foi realizada utilizando-se o reagente fluorescente *SYBR® Green I* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), o qual detecta a síntese de cDNA no sistema de PCR em Tempo Real 7500 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). As condições de amplificação da PCR foram as seguintes: i) Etapa inicial para a ativação da DNA polimerase, por 5 minutos a 95 °C; ii) Quarenta ciclos, cada um com duração de 15 segundos, a 95 °C para a desnaturação da molécula de DNA; iii) Trinta e cinco segundos a 60 °C para anelamento dos iniciadores (*primers*); iv) E 15 segundos a 72 °C para a extensão das cadeias de DNA. Decorrido este procedimento, uma análise de curva de fusão foi incluída e a fluorescência foi medida a 60–

99 °C para se verificar a especificidade dos iniciadores e a ausência de dímeros de iniciadores e demonstrou, em todos os casos, um único pico. Todos os ensaios em tempo real foram realizados em quadruplicata e um controle negativo de transcriptase reversa foi incluído. *Gapd* e *Hprt1* foram utilizados como genes de referência. As sequências dos iniciadores dianteiros (*forward primers*) e opostos (*reverse primers*) utilizados são ilustradas na Tabela 1. O rendimento por amostra foi calculado utilizando-se o programa *LinRegPCR* 2012.3 (<http://LinRegPCR.nl>), enquanto que a estabilidade dos genes de referência, bem como o número ótimo de genes de referência de acordo com a variação de pares (*V*) foram analisados pelo programa *GeNorm* 3.5 (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Os níveis de expressão de RNA mensageiro (RNAm) foram determinados empregando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Bustin et al., 2013).

Tabela 1.

Gene	Iniciadores dianteiros (<i>forward primers</i>)	Iniciadores opostos (<i>reverse primers</i>)	Referência
<i>Gapd</i>	5'- TCACCACCATGGAGA AGGC-3'	5'- GCTAAGCAGTTGGT GGTGCA-3'	Bonefeld et al., 2008
<i>Hprt1</i>	5'- GCAGACITTTGCTTTCC TTGG-3'	5'- CGAGAGGTCCTTTT CACCAG-3'	Bonefeld et al., 2008
<i>Sirt1</i>	5'- CTGTTTCCTGTGGGAT ACCTGACT-3'	5'- ATCGAACATGGCTT GAGGATCT-3'	Borengasser et al., 2011
<i>Sirt6</i>	5'- CCGTCTGGTCATTGTC AACCT-3'	5'- GCTTCATGAGCTTG CACATCAC-3'	Borengasser et al., 2011
<i>Parp1</i>	5'- GGACCACCAACTTCG CAGGCATCC-3'	5'- CGGGTCTCCCTGAG ACGTGTGGCAG-3'	Delineado pelo autor

Sequências de iniciadores (*primers*) utilizadas nos experimentos de reação em cadeia da DNA polimerase (PCR; EC 2.7.7.7) quantitativa em tempo real incluídas no presente estudo. *Gapd* e *Hprt1* correspondem a genes de referência. *Sirt1*, *Sirt6* e *Parp1* correspondem aos genes murinos relacionados às proteínas sirtuína 1, sirtuína 6 e poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1, respectivamente. (Tabela elaborada pelo autor).

3.7 DETERMINAÇÃO DE CONTEÚDO PROTEICO

O conteúdo total de proteínas foi mensurado de acordo com o método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram realizados em duplicata e a média foi utilizada na análise. Os dados foram comparados por meio do teste *t* de Student para amostras independentes. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico *IBM SPSS Statistics* (IBM, Armonk, Nova Iorque, Estados Unidos). As figuras de gráficos representativos dos resultados foram geradas utilizando-se a versão 5.0 do programa *GraphPad Prism* para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

Inicialmente, foram determinados os níveis séricos de Phe em animais submetidos aos modelos experimentais de HPA aguda e crônica. Demonstrou-se que estes níveis estavam significativamente aumentados no grupo submetido à HPA aguda, em comparação com o grupo controle ($p = 0,001$; Figura 7).

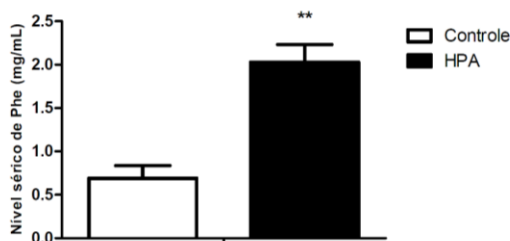


Figura 7: Níveis séricos do aminoácido fenilalanina (Phe) em ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em miligrama por mililitro (mg/mL). ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

Por outro lado, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis de Phe no soro dos animais submetidos ao modelo de HPA crônica, em comparação ao grupo controle ($p = 0,155$; Figura 8).

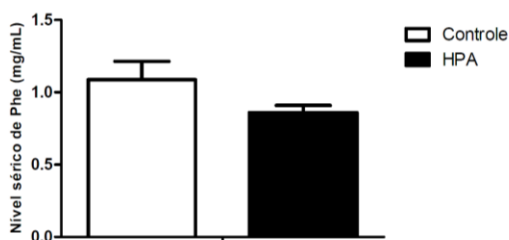


Figura 8: Níveis séricos do aminoácido fenilalanina (Phe) em ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em miligrama por mililitro (mg/mL). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste t de Student para amostras independentes).

O próximo passo foi avaliar a atividade das enzimas DNMTs em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de animais submetidos ao modelo de HPA aguda. A Figura 9 indica que houve uma diminuição desta atividade enzimática no hipocampo, em comparação ao grupo controle ($p = 0,029$). Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas demais estruturas cerebrais avaliadas ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,208$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,069$).

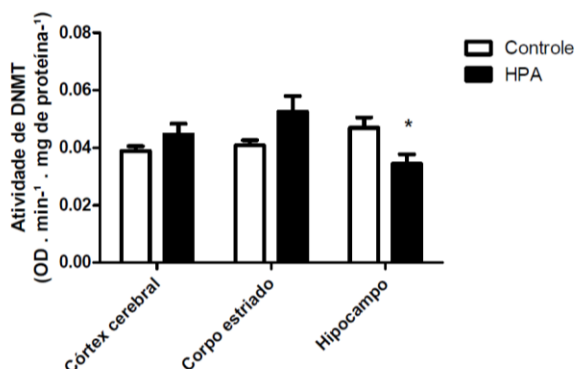


Figura 9: Atividade de enzima ácido desoxirribonucleico metiltransferase (DNMT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em densidade óptica (OD) . min⁻¹. mg de proteína⁻¹. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

A atividade das DNMTs também foi avaliada em estruturas cerebrais dos animais submetidos à HPA crônica. Diferentemente do modelo animal agudo, tais atividades enzimáticas encontraram-se aumentadas em todas as estruturas cerebrais avaliadas quando comparados àquelas encontradas nas mesmas estruturas de animais do grupo controle ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,0001$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,001$; $p(\text{hipocampo}) = 0,001$; Figura 10).

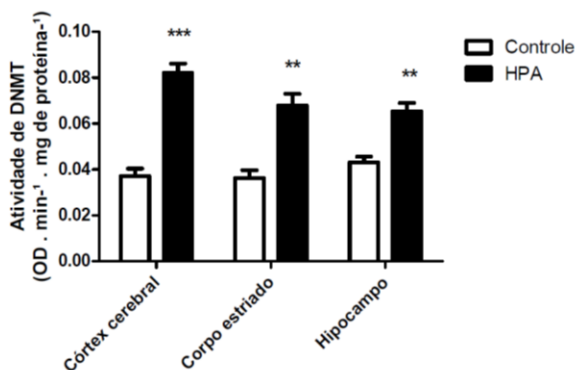


Figura 10: Atividade de enzima ácido desoxirribonucleico metiltransferase (DNMT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em densidade óptica (OD) \cdot min⁻¹ \cdot mg de proteína⁻¹. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

A seguir, foi avaliada a atividade enzimática das HATs em estruturas cerebrais de animais submetidos aos modelos de HPA aguda e crônica. Os animais submetidos à HPA aguda não apresentaram diferenças nessas atividades em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo em comparação ao animais do grupo controle ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,386$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,461$; $p(\text{hipocampo}) = 0,395$), como observado na Figura 11.

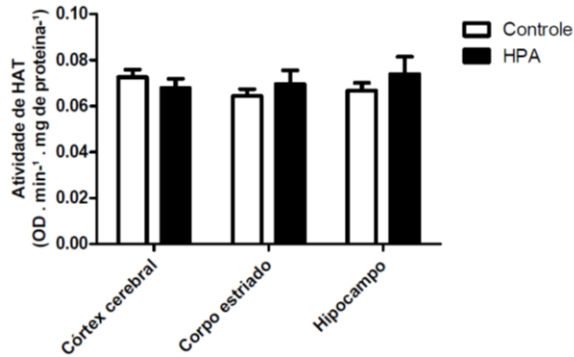


Figura 11: Atividade de enzima histona acetiltransferase (HAT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em densidade óptica (OD) \cdot min⁻¹ \cdot mg de proteína⁻¹. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (teste *t* de Student para amostras independentes).

De forma semelhante, a atividade das HATs não foi alterada em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas em animais submetidos ao modelo crônico de HPA, quando comparados com o grupo controle ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,954$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,065$; $p(\text{hipocampo}) = 0,871$; Figura 12).

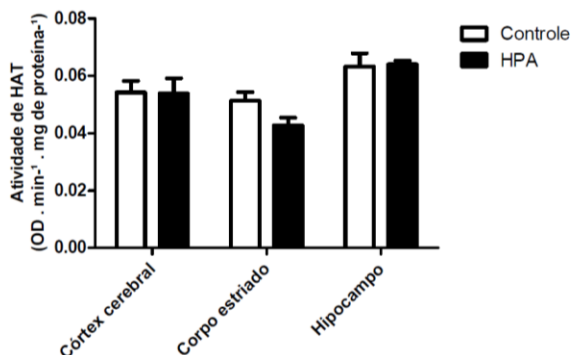


Figura 12: Atividade de enzima histona acetiltransferase (HAT) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em densidade óptica (OD) \cdot min⁻¹ \cdot mg de proteína⁻¹. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (teste *t* de Student para amostras independentes).

A seguir, foi avaliada a atividade das HDACs em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de animais submetidos a modelos crônicos e agudos de HPA induzidos quimicamente. A Figura 13 demonstra um aumento significativo desta atividade enzimática em animais submetidos à HPA aguda em todos os tecidos cerebrais analisados, em comparação com o grupo controle ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,011$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,016$; $p(\text{hipocampo}) = 0,001$).

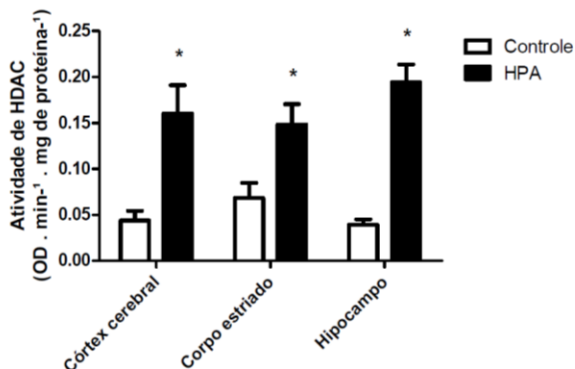


Figura 13: Atividade de enzima histona desacetilase (HDAC) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em densidade óptica (OD) · min⁻¹ · mg de proteína⁻¹. * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

Similarmente, foi observado um aumento da atividade das HDACs nas três estruturas cerebrais analisadas em animais submetidos ao modelo experimental de HPA crônica, em comparação com o grupo controle (p (córtex cerebral) = 0,0001; p (corpo estriado) = 0,005; p (hipocampo) = 0,0001; Figura 14).

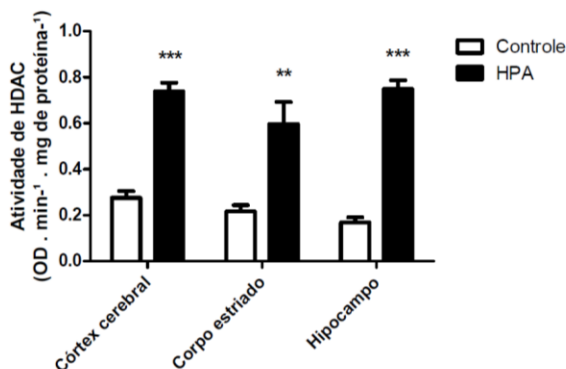


Figura 14: Atividade de enzima histona desacetilase (HDAC) detectada em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em densidade óptica (OD) . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

Considerando-se que as sirtuínas são uma importante classe de HDACs, o próximo passo deste estudo foi avaliar a expressão dos genes que codificam as proteínas SIRT1 e SIRT6 (em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de ratos submetidos a modelos de HPA aguda e crônica). Neste sentido, nos animais com HPA aguda, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à expressão de SIRT1 quando comparada à observada nos animais do grupo controle ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,5022$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,8463$; $p(\text{hipocampo}) = 0,6726$; Figura 15).

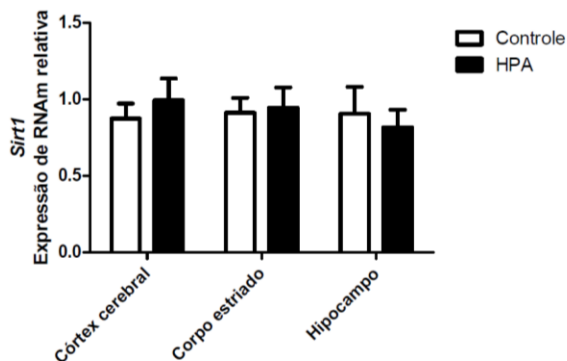


Figura 15: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 1 (*Sirt1*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

Analogamente, a expressão gênica desta mesma proteína não foi modificada, em nenhuma estrutura cerebral avaliada, pelas altas concentrações de Phe sustentadas no modelo de HPA crônica ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,493$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,768$; $p(\text{hipocampo}) = 0,692$; Figura 16).

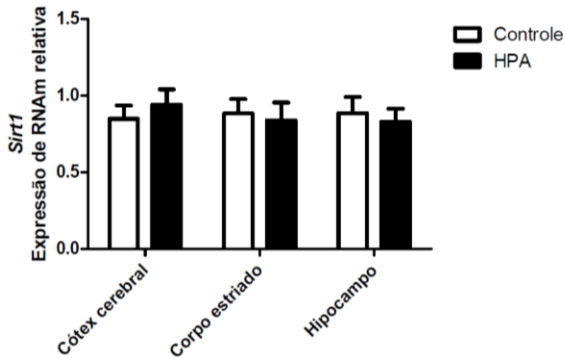


Figura 16: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 1 (*Sirt1*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

Outrossim, a expressão gênica da proteína SIRT6 não foi alterada nas estruturas cerebrais investigadas de animais submetidos à HPA aguda, em comparação ao grupo controle ($p(\text{cortex cerebral}) = 0,231$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,888$; $p(\text{hipocampo}) = 0,444$; Figura 17).

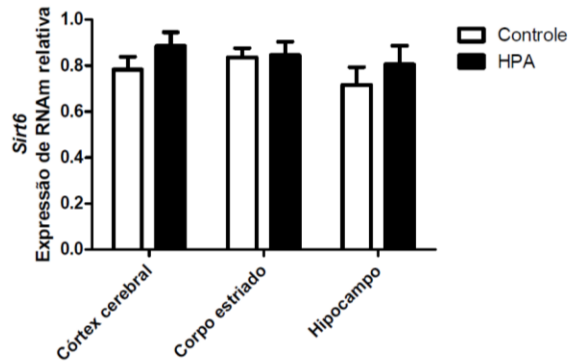


Figura 17: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 6 (*Sirt6*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

A expressão gênica da mesma proteína também não foi alterada nas estruturas cerebrais de animais submetidos ao modelo experimental de HPA crônica, como observado na Figura 18 ($p(\text{cortex cerebral}) = 0,281$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,764$; $p(\text{hipocampo}) = 0,344$).

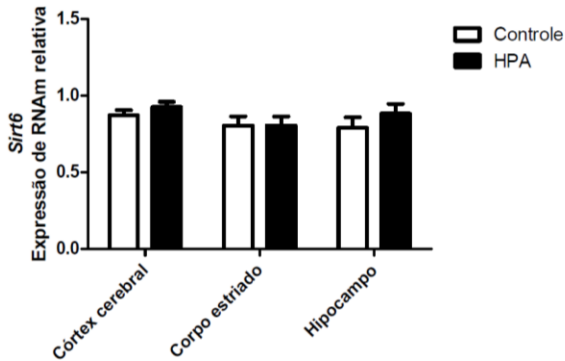


Figura 18: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima sirtuína 6 (*Sirt6*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

Por fim, foi avaliada a expressão gênica da proteína PARP1 em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de animais expostos a altas concentrações de Phe de forma aguda e crônica. Nesse sentido, a Figura 19 demonstra que a expressão gênica desta proteína não foi alterada no modelo animal de HPA aguda em nenhuma das estruturas cerebrais estudadas ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,76$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,449$; $p(\text{hipocampo}) = 0,115$).

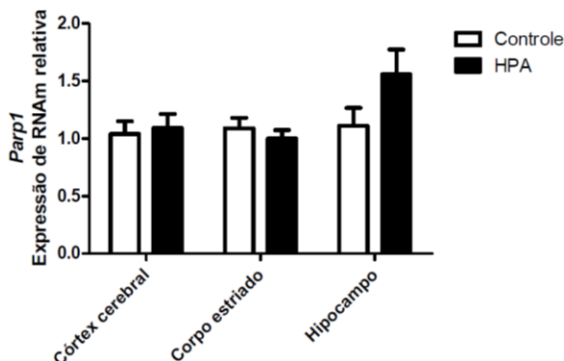


Figura 19: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1 (*Parp1*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) aguda. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

A expressão desta mesma proteína também não foi alterada nas estruturas cerebrais de animais submetidos ao modelo experimental de HPA crônica ($p(\text{córtex cerebral}) = 0,372$; $p(\text{corpo estriado}) = 0,971$; $p(\text{hipocampo}) = 0,392$), como observado na Figura 20.

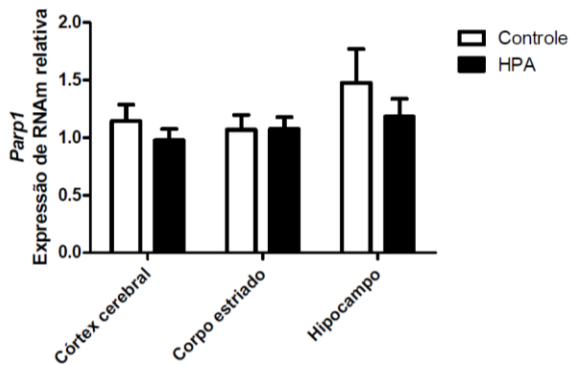


Figura 20: Níveis de expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) relativa do gene correspondente à enzima poli(difosfato de adenosina [ADP]-ribose) polimerase 1 (*Parp1*) em estruturas cerebrais de ratos submetidos ao modelo experimental de hiperfenilalaninemia (HPA) crônica. Os valores representam média \pm erro padrão da média e estão expressos em unidades arbitrárias. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os níveis séricos de Phe estavam significativamente aumentados nos animais submetidos ao modelo agudo de HPA, em comparação com o grupo controle. Além disso, a atividade das DNMTs apresentou-se inibida em hipocampo de animais recebendo Phe agudamente. Em contraste, um aumento significativo na atividade destas enzimas foi detectado em todas as estruturas cerebrais em animais submetidos ao modelo crônico de HPA. Já a atividade das HDACs nas estruturas cerebrais dos animais aguda ou cronicamente submetidos à HPA apresentou-se significativamente aumentada, em comparação com o grupo controle. A atividade das HATs, bem como a expressão gênica das sirtuínas e de PARP1 não diferiram significativamente entre os grupos experimentais.

Por outro lado, não foi observada diferença significativa nos níveis de Phe entre os animais recebendo Phe cronicamente e o grupo controle, um achado que se relaciona, em parte, com o estudo realizado por McKean e colaboradores (1968). Estes pesquisadores demonstraram que a administração intraperitoneal de Phe (6,05 μmol por grama de peso corporal) em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley (4–5 semanas de vida) provocou diminuição significativa no conteúdo cerebral dos L-aminoácidos treonina, valina, metionina, isoleucina, histidina e triptofano 30–60 minutos após a injeção, tempo este suficiente para que fosse detectado um pico no nível plasmático de Phe. Todavia, esta alteração cerebral não foi observada 180 minutos após a injeção e tampouco em animais da mesma linhagem e idade similar recebendo dieta suplementada com Phe (7%) durante três semanas (McKean et al., 1968). Estes achados indicam que a administração intraperitoneal de Phe em ratos produz um pico nos níveis plasmáticos deste aminoácido aproximadamente 60 minutos após a injeção, tempo a partir do qual poderia se iniciar uma depuração lenta e gradual de Phe em plasma que contribuiria para a diminuição de seus níveis até que estes fossem similares aos observados em ratos do grupo controle, possivelmente conforme observado no presente trabalho. É importante ressaltar também que, como as alterações epigenéticas detectadas em estruturas cerebrais foram mais pronunciadas em animais submetidos ao modelo de HPA crônica quando comparado à HPA aguda, o acúmulo de Phe poderia se apresentar em tecido cerebral, mas não em plasma, de animais recebendo este aminoácido cronicamente.

No contexto da modificação epigenética, a metilação do DNA contribuiu para a geração de alelos mutados envolvidos na patogênese

da PKU humana. Para ilustrar, a metilação de resíduos de citosina em sítios CpG pode ter deflagrado a decomposição da 5'-metilcitosina resultante em timina, conforme demonstrado na mutação prevalente c.1222C>T do gene *PAH* (Murphy et al., 2006). É importante ressaltar que os estudos epigenômicos realizados em modelos animais e pacientes com PKU até o momento envolvem essencialmente o mecanismo da metilação do DNA (Li et al., 2013; Dobrowolski et al., 2014, 2015 e 2016; Item et al., 2017).

Neste cenário, Li e colaboradores (2013) demonstraram que o promotor do gene correspondente a uma enzima envolvida na biossíntese de arginina – a argininosuccinato sintase (EC 6.3.4.5) – é extensamente metilado em leucócitos de crianças fenilcetonúricas sem dieta restrita em Phe, quando comparadas a crianças saudáveis. Estes pesquisadores demonstraram também uma diminuição significativa na expressão gênica desta proteína, secundária à metilação de seu gene correspondente, contribuindo para a diminuição dos níveis plasmáticos de L-arginina em fenilcetonúricos (Li et al., 2013). Em relação à síndrome de PKU materna, Dobrowolski e colaboradores (2014) detectaram intensa metilação em genes cerebrais de fetos de fêmeas de camundongos com HPA (*Pah*^{enu2}) sem dieta apropriada, em comparação com as matrizes transgênicas com dieta restrita em Phe. Estes genes incluíam genes de microRNAs (RNAs de sequência curta que impedem a transcrição de seus genes alvo) e de desenvolvimento de espinhas dendríticas, alguns dos quais tiveram sua expressão reduzida na descendência de matrizes com HPA sem restrição dietética de Phe (Dobrowolski et al., 2014).

Extensa metilação do DNA foi também detectada por Dobrowolski e colaboradores (2015) em leucócitos e em tecido cerebral obtido *post mortem* de pacientes com PKU, quando comparados a leucócitos obtidos de pacientes com PKU em dieta adequada e tecido cerebral de indivíduos saudáveis obtido *post mortem*. Os genes envolvidos incluíam genes de microRNAs e de proteínas estruturais de neurônios. Além disso, a metilação do DNA em leucócitos foi detectada tanto em pacientes em dieta com restrição de Phe quanto em pacientes sem este controle, embora os pacientes sujeitos à maior exposição ao aminoácido apresentaram DNA mais extensamente metilado quando comparados aos pacientes com PKU em dieta apropriada (Dobrowolski et al., 2015). Em outro estudo liderado pelo mesmo pesquisador (2016), a metilação anormal de promotores de genes foi identificada em tecido cerebral de camundongos *Pah*^{enu2} sem dieta com restrição de Phe, quando comparados a camundongos da mesma linhagem em dieta apropriada,

embora o nível plasmático e o tempo de exposição à Phe tenham se correlacionado com a intensidade da metilação de DNA detectada. Outra alteração detectada neste estudo foi a desmetilação de genes de microRNAs, cujos alvos incluem genes de suporte sináptico e axonal. Dobrowolski e colaboradores (2016) concluíram que padrões de metilação de DNA anormais podem resultar em alterações na expressão gênica pela metilação de promotores de genes ou pela transcrição desregulada de genes de microRNAs.

Embora a atividade de enzimas envolvidas na metilação do DNA não tenha sido avaliada nos estudos epigenômicos realizados no contexto da PKU supracitados, estas pesquisas corroboram, em parte, os achados do presente estudo. Analisada isoladamente, a metilação do DNA catalisada pelas DNMTs pode ativar ou silenciar genes, este último processo sendo relacionado com a metilação em promotores (Jin et al., 2011). Por outro lado, a acetilação de histonas é geralmente associada com a ativação da transcrição gênica (Horikoshi, 2013). Considerando-se o fato da metilação do DNA e a acetilação de histonas poderem atuar em sinergismo para influenciar a expressão gênica (Li e Seto, 2016), o aumento na atividade das DNMTs e HDACs em estruturas cerebrais de animais submetidos à administração de Phe sugere que esta exposição do tecido cerebral ao aminoácido acumulado pode ter induzido um estado de expressão gênica global reprimida. Esta generalização se aplica especialmente aos ratos recebendo Phe cronicamente, o que parece concordar com os dados apresentados por Dobrowolski e colaboradores (2014-6), segundo os quais o tempo de exposição do tecido cerebral ao aminoácido pode ser proporcional à intensidade das alterações epigenéticas analisadas. Uma suposta repressão da transcrição gênica cerebral no presente estudo poderia prescindir da inibição das HATs, cuja atividade em tecido cerebral de animais submetidos à HPA aguda ou crônica não diferiu significativamente daquela detectada no grupo controle.

O estresse oxidativo foi implicado na fisiopatologia da PKU, de modo que a administração de agentes antioxidantes como o ácido lipoico impediu a modificação oxidativa de lipídeos, proteínas e DNA, bem como a alteração em enzimas antioxidantes em ratos hiperfenilalaninêmicos (Moraes et al., 2013). Além disso, este processo é associado com desregulação epigenética e alteração da expressão gênica em mamíferos (Chervona e Costa, 2012). Para ilustrar, a desmetilação do promotor do alelo *TGATTGGTTG* da enzima glutatona peroxidase 3 (EC 1.11.1.9) foi identificada em um neonato fenilcetonúrico com nível plasmático de Phe elevado ($\approx 7,68$ mg/dL),

em comparação com indivíduos saudáveis e pacientes apresentando HPA menos pronunciada, indicando que esta alteração epigenética pode ser uma resposta inicial ao excesso de espécies reativas de oxigênio induzido por acúmulo de Phe (Item et al., 2017).

Em camundongos, um estímulo estressor agudo como o nado forçado resultou em desmetilação de DNA em sítios CpG próximos ao promotor do gene homólogo ao oncogene viral do osteosarcoma murino Finkel-Biskis-Jinkins (*c-Fos*) e no promotor do gene da proteína 1 responsiva ao desenvolvimento precoce (*Egr-1*) no giro denteado do hipocampo (Saunderson et al., 2016). Considerando-se este achado e o papel chave supracitado das DNMTs na metilação do DNA e regulação da expressão gênica, é possível que a inibição destas enzimas em hipocampo de ratos submetidos à HPA aguda contribua em parte no processo de resposta ao estresse induzido por acúmulo de Phe em hipocampo, potencialmente caracterizado pela ativação de genes de resposta a estímulo estressor através da desmetilação de suas regiões promotoras.

Outra modificação epigenética relevante é a modificação covalente de histonas. A metilação, acetilação e acilação destas proteínas foram implicadas na fisiopatologia de certas doenças metabólicas hereditárias, um grupo de distúrbios no qual a PKU está incluída. Nesse sentido, na fibrose cística (OMIM 219700), a acetilação da histona H4 no promotor do gene da interleucina 8 foi detectada em linhagens celulares apresentando deficiência do regulador de condutância transmembrana de fibrose cística (CFTR), contribuindo para a resposta inflamatória relacionada a este distúrbio (Bartling e Drumm, 2009). Além disso, a atividade de HDACs é necessária para a localização perinuclear do gene *CFTR* inativo, uma vez que a hiperacetilação de histona H3 em uma região próxima de seu promotor é responsável pela ativação e migração deste gene em direção ao interior do núcleo celular na presença de inibidor de HDAC (Muck et al., 2012). Na acidemia metilmalônica (OMIM 251000), outro erro inato do metabolismo, a administração de propionato, metabólito tipicamente acumulado nesta condição, induziu a expressão de genes associados à hemoglobina fetal, hiperacilação de histona H3 e repressão da expressão gênica associada à γ -globulina em células da linhagem eritroide murina cultivadas (Karkashon et al., 2015). Já na galactosemia clássica (OMIM 230400), a metilação de histona H4 no promotor do gene da superóxido dismutase 2 (EC 1.15.1.1) e induzida por acúmulo de D-galactose foi implicada no desenvolvimento da retinopatia que pode se manifestar nesta doença (Zhong e Kowluru, 2011). Também foi observado que, na adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X (OMIM 300100), a administração de certos fármacos

inibidores de HDACs induziu diminuição significativa nos níveis de ácidos graxos de cadeia muito longa em fibroblastos derivados de pacientes afetados por este distúrbio, os quais apresentam uma mutação no gene do membro 1 da subfamília D de cassetes ligantes de trifosfato de adenosina (*ABCD1*) (Singh et al., 2011). Em contraste ao número crescente de evidências a respeito da modificação de histonas nos erros inatos supracitados, não há ainda estudos que se relacionem com modificação de histonas no âmbito da fisiopatologia da PKU. Neste sentido, o presente estudo demonstrou que a atividade das HDACs está significativamente aumentada em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de ratos na presença de níveis elevados de Phe, possivelmente contribuindo para a alteração na transcrição gênica associada à modificação de histonas nestas estruturas cerebrais.

Até o momento, o envolvimento das HDACs da classe das sirtuínas na fisiopatologia da PKU também não foi descrito. O fato da expressão das sirtuínas 1 e 6 em animais submetidos à HPA não ter diferido daquela em animais do grupo controle neste estudo não elimina a possibilidade destas isoformas de HDAC terem apresentado alteração em suas atividades. Além disso, não se pode descartar que estas tenham desempenhado alguma função no sentido de neutralizar o estresse sobre funções celulares induzido pelo acúmulo de Phe. Um eventual aumento na atividade destas isoformas poderia ter contribuído para o aumento significativo da atividade global de HDACs detectado em tecidos cerebrais de animais submetidos à HPA aguda e crônica.

No contexto do reparo do dano ao DNA, a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) é um composto resultante da oxidação de nucleosídeos de desoxiguanosina presentes no DNA, sendo considerada um marcador de dano oxidativo induzido contra esta macromolécula (Wu et al., 2004). Schulpis e colaboradores (2005) detectaram níveis séricos significativamente elevados de 8-OHdG em pacientes fenilcetonúricos sem terapia dietética adequada, em comparação com pacientes em dieta restrita em Phe e indivíduos saudáveis. Uma correlação positiva entre os níveis séricos de 8-OHdG e de Phe, bem como uma correlação negativa entre a capacidade antioxidante total e os níveis séricos de 8-OHdG foram também demonstradas por estes pesquisadores (Schulpis et al., 2005). Conforme demonstrado por ensaio cometa alcalino em sangue periférico e em córtex cerebral de ratos submetidos à HPA aguda induzida quimicamente, o dano ao DNA foi implicado na fisiopatologia da PKU (Simon et al., 2013), podendo ser dependente de dose, conforme observado em DNA de leucócitos humanos expostos à Phe *in vitro* e em leucócitos de pacientes com PKU,

quando comparados a indivíduos saudáveis (Sitta et al., 2009b). Leucócitos humanos expostos a níveis elevados de Phe (1 e 2,5 mM) apresentaram maior índice de dano ao DNA quando comparados a leucócitos expostos às mesmas concentrações deste aminoácido juntamente com o agente antioxidante L-carnitina, sugerindo que o dano ao DNA induzido por Phe esteja relacionado com estresse oxidativo (Deon et al., 2015). Adicionalmente, em pacientes com PKU suplementados com este antioxidante, a excreção urinária de 8-OHdG se correlacionou positivamente com os níveis plasmáticos de Phe e negativamente com os níveis de L-carnitina e de grupos sulfidril em proteínas (Deon et al., 2015).

Embora o dano ao DNA possa estar imbricado na fisiopatologia da PKU, potencialmente contribuindo para a ativação de vias de reparo desta macromolécula, o presente estudo não detectou diferença significativa na expressão da enzima PARP1 murina entre animais submetidos à HPA e o grupo controle. Tal achado não exclui a possibilidade da PARP1 e seus homólogos atuarem no reparo do DNA em cenários experimentais onde o acúmulo de Phe relacionado à PKU esteja presente. Entretanto, considerando-se que células e tecidos em um meio saturado com este aminoácido estejam mais suscetíveis ao dano ao DNA do que as células e tecidos na condição de controles, a indução da expressão desta enzima poderia representar uma vantagem biológica para as células expostas à Phe, de modo que estas poderiam dispor de maior arsenal molecular para neutralizar a citotoxicidade induzida pelo aminoácido e potencialmente relacionada a estresse oxidativo. Teoricamente, o aumento no número de moléculas de PARP1 poderia, em parte, contribuir para preservar a atividade global destas proteínas atuando em um meio pró-oxidante, quando comparado com o simples aumento na atividade das moléculas já existentes e sujeitas à modificação oxidativa.

As análises bioquímicas do presente estudo foram determinadas em soro e em corpo estriado, córtex cerebral e hipocampo de ratos. Estudos realizados em pacientes fenilcetonúricos e em modelos animais de PKU demonstraram que estas duas últimas estruturas cerebrais estão entre as áreas mais afetadas por este distúrbio metabólico hereditário (Christ et al., 2010; Adler-Abramovich et al., 2012; Pascucci et al., 2013). Neste cenário, neurônios corticais murinos cultivados na presença de Phe apresentaram elevada incidência de inibição de crescimento de neuritos e de morte celular (Li et al., 2010). Em relação aos neurônios hipocampusais, a presença de Phe (20 mM) no meio de cultivo destas células foi associada a alterações de brotamento dendrítico, incluindo

diminuição no número de ramificações dendríticas por neurônio, e ao aumento na densidade da proteína pré-sináptica sinaptofisina, em comparação com culturas controles apropriadas (de Luigi et al., 2015).

Adicionalmente, a deficiência cognitiva observada em pacientes com PKU (Anwar et al., 2013; Weglage et al., 2013) foi associada a uma disfunção no sistema de inibição comportamental envolvendo a área pré-frontal do córtex cerebral (Stevenson e McNaughton, 2013). Uma atividade neural atípica em córtex pré-frontal, bem como uma diminuição do número de conexões nesta região e entre esta área e o tecido cerebral adjacente também foram observadas nestes pacientes, possivelmente contribuindo para o comprometimento de funções executivas associado à PKU, ainda que tratada precocemente (Christ et al., 2010). Alterações no parênquima cerebral também foram detectadas nestes indivíduos, incluindo um aumento no volume de substância cinzenta na porção ventral do corpo estriado e uma diminuição neste parâmetro em áreas motoras do córtex cerebral, em comparação com controles saudáveis (Pérez-Dueñas et al., 2006). Similarmente, uma diminuição no volume de substância cinzenta foi detectada na porção parietal e occipital do córtex cerebral em pacientes fenilcetonúricos, conforme determinado por análises morfométricas (Christ et al., 2016). Ainda, uma redução no volume do hipocampo (Pfaendner et al., 2005), bem como um aumento no volume de uma estrutura do corpo estriado denominada putâmen (Bodner et al., 2012), foram também detectados em pacientes fenilcetonúricos, quando comparados a controles saudáveis apropriados. Os dados dos estudos *in vitro* e *in vivo* supracitados enfatizam a importância do córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo na fisiopatologia da PKU e sugerem que as modificações morfológicas e funcionais nestas estruturas podem ser cruciais para a disfunção neurológica observada em fenilcetonúricos. A desregulação epigenética indicada pelo presente estudo pode, em parte, contribuir para o fenótipo aberrante das células que constituem estas três áreas cerebrais na presença de Phe.

O presente estudo demonstrou que a administração de Phe e seu análogo *p*-Cl-Phe em modelos experimentais murinos de HPA induz alteração em parâmetros epigenéticos em estruturas cerebrais. Embora os níveis séricos de Phe nos animais recebendo este aminoácido cronicamente não tenham diferido daqueles detectados no grupo controle, as alterações epigenéticas observadas foram significativas em comparação a este último grupo, sugerindo que sua intensidade pode ter sido proporcional ao tempo de exposição do tecido cerebral à Phe no modelo de HPA crônica. Conforme supracitado, a atividade das DNMTs

contribui para a metilação do DNA, enquanto que a ativação das HDACs favorece a desacetilação de histonas. Coletivamente, estas alterações podem acarretar remodelamento de cromatina e diminuição da transcrição gênica nas áreas cerebrais analisadas. É possível que tais modificações tenham sido causadas, em parte, por estresse oxidativo, contribuindo para a diminuição da exposição de sequências de DNA ao ataque de espécies reativas no núcleo celular. Visto que parte destas sequências pode compor genes, a desregulação epigenética detectada pode desencadear diminuição da transcrição gênica em geral (Figura 21), potencialmente colaborando para a diminuição da síntese proteica cerebral, hipomielinização, alterações neuroquímicas e sinápticas em pacientes fenilcetonúricos.

As atividades das DNMTs e HDACs podem representar novos alvos terapêuticos para a PKU, conforme indicado por este estudo. A modulação da atividade destas enzimas pelo uso de fármacos como os inibidores de HDACs pode contribuir para atenuar os danos cerebrais atribuídos à PKU e parcialmente mediados por modificações epigenéticas. Este fato poderia colaborar para uma mudança de paradigma na terapia da PKU: de uma abordagem tipicamente preventiva, tendo a restrição dietética de Phe como pilar principal, para uma abordagem mais curativa, capaz de mitigar algumas consequências neurológicas deste distúrbio. Todavia, estudos adicionais são necessários para se avaliar o impacto da inibição destas enzimas sobre o papel biológico do genoma, a fim de se elaborar inibidores mais específicos e, por conseguinte, com menor probabilidade de produzir efeitos adversos ao serem utilizados como potenciais princípios ativos de medicamentos.

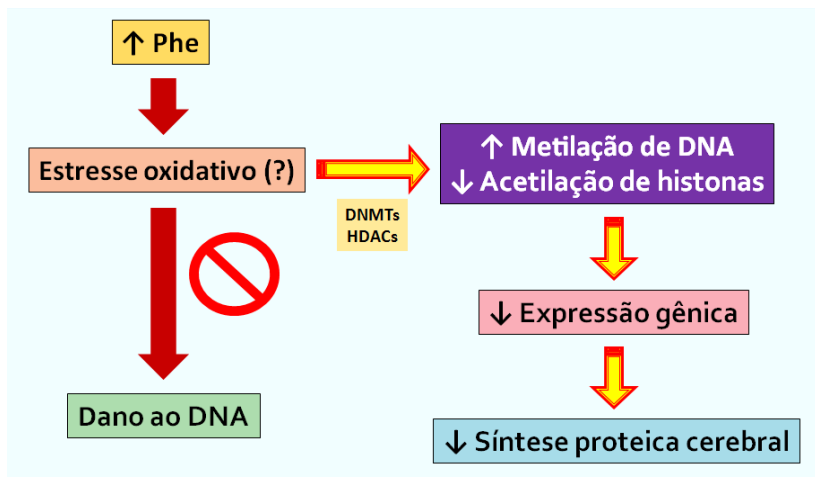


Figura 21: Diagrama que ilustra a associação entre a exposição de células e tecidos ao acúmulo de Phe (↑ Phe) e as alterações epigenéticas capazes de interferir na expressão gênica no contexto da hiperfenilalaninemia e fenilcetonúria clássica. O ↑ Phe pode desencadear dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA), potencialmente pela indução de estresse oxidativo. As células sujeitas a tal insulto podem utilizar mecanismos preventivos, incluindo a ativação de DNA metiltransferases (DNMTs; EC 2.1.1.37) e histonas desacetilases (HDACs; EC 3.5.1.98), a fim de favorecer modificações estruturais de cromatina e tornar os genes menos acessíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio presentes na condição de estresse oxidativo. (Figura elaborada pelo autor).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a HPA, tanto aguda quanto crônica, induziu alterações da atividade das enzimas DNMTs e HDACs, importantes parâmetros epigenéticos, em córtex cerebral, corpo estriado e hipocampo de ratos. Mais especificamente, detectou-se diminuição significativa da atividade das DNMTs em hipocampo de ratos recebendo Phe agudamente, ao passo que a atividade das HDACs estava aumentada nestes mesmos animais. Em contraste, um aumento da atividade das DNMTs e HDACs foi detectado em estruturas cerebrais de ratos recebendo Phe cronicamente. Em suma, estes achados sugerem que os animais submetidos à HPA são propensos ao remodelamento da cromatina e à diminuição global da expressão gênica em tecido cerebral, contribuindo potencialmente para o entendimento da disfunção neurológica observada em pacientes fenilcetonúricos.

REFERÊNCIAS

- Adler-Abramovich L, Vaks L, Carny O, Trudler D, Magno A, Caflisch A, Frenkel D, Gazit E. Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria. *Nat Chem Biol.* 2012; 8(8): 701-6.
- Albrecht J, Garbade SF, Burgard P. Neuropsychological speed tests and blood phenylalanine levels in patients with phenylketonuria: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33(3): 414-21.
- Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010; 99 Supl 1: S3-9.
- Anwar MS, Waddell B, O'Riordan J. Neurological improvement following reinstitution of a low phenylalanine diet after 20 years in established phenylketonuria. *BMJ Case Rep.* 2013; 2013. pii: bcr2013010509.
- Aoki K. Long term follow-up of patients with inborn errors of metabolism detected by the newborn screening program in Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003; 34 Supl 3: 19-23.
- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11(5): 384-400.
- Balestrieri ML, Rizzo MR, Barbieri M, Paolisso P, D'Onofrio N, Giovane A, Siniscalchi M, Minicucci F, Sardu C, D'Andrea D, Mauro C, Ferraraccio F, Servillo L, Chirico F, Caiazzo P, Paolisso G, Marfella R. Sirtuin 6 expression and inflammatory activity in diabetic atherosclerotic plaques: effects of incretin treatment. *Diabetes.* 2015; 64(4): 1395-406.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011; 21(3): 381-95.
- Bartling TR, Drumm ML. Loss of CFTR results in reduction of histone deacetylase 2 in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009; 297(1): L35-43.
- Berti SL, Bonan CD, da Silva FL, Battastini AM, Sarkis JJ, Wannmacher CM. Phenylalanine and phenylpyruvate inhibit ATP diphosphohydrolase from rat brain cortex. *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19(7): 649-53.
- Berti SL, Nasi GM, Garcia C, Castro FL, Nunes ML, Rojas DB, Moraes TB, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM. Pyruvate and creatine prevent oxidative stress and behavioral alterations caused by phenylalanine administration into hippocampus of rats. *Metab Brain Dis.* 2012; 27(1): 79-89.

- Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014; 14(6): 655-71.
- Bodner KE, Aldridge K, Moffitt AJ, Peck D, White DA, Christ SE. A volumetric study of basal ganglia structures in individuals with early-treated phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2012; 107(3): 302-7.
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse.* 2008; 62(4): 302-9.
- Borengasser SJ, Lau F, Kang P, Blackburn ML, Ronis MJ, Badger TM, Shankar K. Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PLoS One.* 2011; 6(8): e24068.
- Bortoluzzi VT, de Franceschi ID, Rieger E, Wannmacher CM. Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochem Res.* 2014; 39(8): 1594-602.
- Bókay J, Kiss E, Simon E, Szőnyi L. Maternal phenylketonuria. *Orv Hetil.* 2013; 154(18): 683-7.
- Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria nº 465, de 23 de maio de 2013. Aprova a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (Anexo). Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf>. Acesso em 27 out. 2015.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 822, de 06 de junho de 2001. Institui, no âmbito do Sistema Único de Saúde, o Programa Nacional de Triagem Neonatal. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2001/prt0822_06_06_2001.html>. Acesso em 27 out. 2015.
- Burchfield JS, Li Q, Wang HY, Wang RF. *JMJD3* as an epigenetic regulator in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015. pii: S1357-2725(15)00191-0.
- Bustin SA, Benes V, Garson J, Helleman J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Wittwer CT, Schjerling P, Day PJ, Abreu M, Aguado B, Beaulieu JF, Beckers A, Bogaert S, Browne JA, Carrasco-Ramiro F, Ceelen L, Ciborowski K, Cornillie P, Coulon S, Cuyper A, De Brouwer S, De Ceuninck L, De Craene J, De Naeyer H, De Spiegelaere W, Deckers K, Dheedene A, Durinck K, Ferreira-Teixeira M, Fieuw A, Gallup JM, Gonzalo-Flores S, Goossens K, Heindryckx F, Herring E, Hoenicka H, Icardi L, Jaggi R, Javad F,

- Karampelias M, Kibenge F, Kibenge M, Kumps C, Lambertz I, Lammens T, Markey A, Messiaen P, Mets E, Morais S, Mudarra-Rubio A, Nakiwala J, Nelis H, Olsvik PA, Pérez-Novo C, Plusquin M, Remans T, Rihani A, Rodrigues-Santos P, Rondou P, Sanders R, Schmidt-Bleek K, Skovgaard K, Smeets K, Tabera L, Toegel S, Van Acker T, Van den Broeck W, Van der Meulen J, Van Gele M, Van Peer G, Van Poucke M, Van Roy N, Vergult S, Wauman J, Tshuikina-Wiklander M, Willems E, Zaccara S, Zeka F, Vandesompele J. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods*. 2013; 10(11): 1063-7.
- Cardinale A, de Stefano MC, Mollinari C, Racaniello M, Garaci E, Merlo D. Biochemical characterization of sirtuin 6 in the brain and its involvement in oxidative stress response. *Neurochem Res*. 2015; 40(1): 59-69.
- Casey L. Caring for children with phenylketonuria. *Can Fam Physician*. 2013; 59(8): 837-40.
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(5): 295-304.
- Chervona Y, Costa M. The control of histone methylation and gene expression by oxidative stress, hypoxia, and metals. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53(5): 1041-7.
- Choi JK, Howe LJ. Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol*. 2009; 87(1): 139-50.
- Christ SE, Moffitt AJ, Peck D. Disruption of prefrontal function and connectivity in individuals with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2010; 99 Suppl 1: S33-40.
- Christ SE, Price MH, Bodner KE, Saville C, Moffitt AJ, Peck D. Morphometric analysis of gray matter integrity in individuals with early-treated phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2016; 118(1): 3-8.
- Clacy A, Sharman R, McGill J. Depression, anxiety, and stress in young adults with phenylketonuria: associations with biochemistry. *J Dev Behav Pediatr*. 2014; 35(6): 388-91.
- Coppus AM. People with intellectual disability: what do we know about adulthood and life expectancy? *Dev Disabil Res Rev*. 2013; 18(1): 6-16.
- Costabeber E, Kessler A, Severo Dutra-Filho C, de Souza Wyse AT, Wajner M, Wannmacher CM. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *Int J Dev Neurosci*. 2003; 21(2): 111-6.
- Couto AM, Lakin ND, Pears CJ. Investigation of DNA repair pathway activity. *Methods Mol Biol*. 2013; 983: 295-310.

- Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 801-17.
- Davar D, Beumer JH, Hamieh L, Tawbi H. Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr Med Chem*. 2012; 19(23): 3907-21.
- Day JJ, Sweatt JD. DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci*. 2010; 13(11): 1319-23.
- de Carvalho TM, dos Santos HP, dos Santos IC, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn screening: a national public health programme in Brazil. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30(4): 615.
- de Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, de Valk HW, Paans AM, Sauer PJ, van Spronsen FJ. Phenylketonuria: reduced tyrosine brain influx relates to reduced cerebral protein synthesis. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 4; 8: 133.
- de Groot MJ, Sijens PE, Reijngoud DJ, Paans AM, van Spronsen FJ. Phenylketonuria: brain phenylalanine concentrations relate inversely to cerebral protein synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015; 35(2): 200-5.
- de Luigi A, Mariani A, De Paola M, Re Depaolini A, Colombo L, Russo L, Rondelli V, Brocca P, Adler-Abramovich L, Gazit E, Del Favero E, Cantù L, Salmona M. Doxycycline hinders phenylalanine fibril assemblies revealing a potential novel therapeutic approach in phenylketonuria. *Sci Rep*. 2015; 5: 15902.
- Deon M, Landgraf SS, Lamberty JF, Moura DJ, Saffi J, Wajner M, Vargas CR. Protective effect of L-carnitine on phenylalanine-induced DNA damage. *Metab Brain Dis*. 2015; 30(4): 925-33.
- Dobrowolski SF, Lyons-Weiler J, Biery A, Spridik K, Vockley G, Kranik E, Skvorak K, Sultana T. Methylome repatterning in a mouse model of maternal PKU syndrome. *Mol Genet Metab*. 2014; 113(3): 194-9.
- Dobrowolski SF, Lyons-Weiler J, Spridik K, Biery A, Breck J, Vockley J, Yatsenko S, Sultana T. Altered DNA methylation in PAH deficient phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2015; 115(2-3): 72-7.
- Dobrowolski SF, Lyons-Weiler J, Spridik K, Vockley J, Skvorak K, Biery A. DNA methylation in the pathophysiology of hyperphenylalaninemia in the PAH^{enu2} mouse model of phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2016; 119(1-2): 1-7.
- Donlon J, Levy H, Scriver CR. Chapter 77: Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Childs B, Sly WS, Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, editores. *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. Nova Iorque: McGraw-Hill; 2008.

- Duran M. Amino acids. In: Blau N, Duran M, Gibson KM, editores. *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics*. Berlim: Springer; 2008.
- Eker AP, Quayle C, Chaves I, van der Horst GT. DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(6): 968-80.
- El Waly B, Macchi M, Cayre M, Durbec P. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci*. 2014; 8: 145.
- Eliseeva ED, Valkov V, Jung M, Jung MO. Characterization of novel inhibitors of histone acetyltransferases. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(9): 2391-8.
- Ercal N, Aykin-Burns N, Gurer-Orhan H, McDonald JD. Oxidative stress in a phenylketonuria animal model. *Free Radic Biol Med*. 2002 1; 32(9): 906-11.
- Fernandes CG, Leipnitz G, Seminotti B, Amaral AU, Zanatta A, Vargas CR, Dutra Filho CS, Wajner M. Experimental evidence that phenylalanine provokes oxidative stress in hippocampus and cerebral cortex of developing rats. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30(2): 317-26.
- Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life*. 2013; 65(4): 341-9.
- Følling A. Über ausscheidung von phenylbrenztraubensäure in den harn als stoffwechselanomalie in verbindung mit imbezillität. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem*. 1934; 227: 169-76.
- Fortson WS, Kayarthodi S, Fujimura Y, Xu H, Matthews R, Grizzle WE, Rao VN, Bhat GK, Reddy ES. Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induce apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells. *Int J Oncol*. 2011; 39(1): 111-9.
- Gajewska J, Ambroszkiewicz J, Chełchowska M, Laskowska-Klita T. Effects of elimination diets on bone metabolism in children and adolescents with phenylketonuria, galactosemia and celiac disease. *Med Wieku Rozwoj*. 2012; 16(1): 61-9.
- Gavande NS, Vander Vere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS, Turchi JJ. DNA repair targeted therapy: the past or future of cancer treatment? *Pharmacol Ther*. 2016; 160: 65-83.
- Gersting SW, Kemter KF, Staudigl M, Messing DD, Danecka MK, Lagler FB, Sommerhoff CP, Roscher AA, Muntau AC. Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet*. 2008; 83(1): 5-17.

- Ghayor C, Weber FE. Epigenetic regulation of bone remodeling and its impacts in osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(9). pii: E1446.
- Gong F, Chiu LY, Miller KM. Acetylation reader proteins: linking acetylation signaling to genome maintenance and cancer. *PLoS Genet.* 2016; 12(9): e1006272.
- Gourovitch ML, Craft S, Dowton SB, Ambrose P, Sparta S. Interhemispheric transfer in children with early-treated phenylketonuria. *J Clin Exp Neuropsychol.* 1994; 16(3): 393-404.
- Grbesa I, Pajares MJ, Martínez-Terroba E, Agorreta J, Mikecin AM, Larráyoz M, Idoate MA, Gall-Troselj K, Pio R, Montuenga LM. Expression of sirtuin 1 and 2 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One.* 2015; 10(4): e0124670.
- Green AR, Caracappa D, Benhasouna AA, Alshareeda A, Nolan CC, Macmillan RD, Madhusudan S, Ellis IO, Rakha EA. Biological and clinical significance of PARP1 protein expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 149(2): 353-62.
- Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev.* 2013; 27(19): 2072-85.
- Guarente L. Sirtuins in aging and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2007; 72: 483-8.
- Guldberg P, Henriksen KF, Sipilä I, Güttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet.* 1995; 32(12): 976-8.
- He Y, Gu X, Lu L, Liang L, Gao J, Zhang X. NOX, the main regulator in oxidative stress in experimental models of phenylketonuria? *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2013; 26(7-8): 675-82.
- He YZ, Gu XF, Lu LH, Liang LL. The oxidative molecular regulation mechanism of NOX in children with phenylketonuria. *Int J Dev Neurosci.* 2014; 38: 178-83.
- Hoeksma M, Reijngoud DJ, Pruim J, de Valk HW, Paans AM, van Spronsen FJ. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab.* 2009; 96(4): 177-82.
- Horikoshi M. Histone acetylation: from code to web and router via intrinsically disordered regions. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(28): 5019-42.
- Huang X, Lu Z, Lv Z, Yu T, Yang P, Shen Y, Ding Y, Fu D, Zhang X, Fu Q, Yu Y. The Fas/Fas ligand death receptor pathway contributes to phenylalanine-induced apoptosis in cortical neurons. *PLoS One.* 2013 7; 8(8): e71553.

- Huemer M, Simma B, Mayr D, Möslinger D, Mühl A, Schmid I, Ulmer H, Bodamer OA. Free asymmetric dimethylarginine (ADMA) is low in children and adolescents with classical phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35(5): 817-21.
- Imperlini E, Orrù S, Corbo C, Daniele A, Salvatore F. Altered brain protein expression profiles are associated with molecular neurological dysfunction in the PKU mouse model. *J Neurochem*. 2014; 129(6): 1002-12.
- Item CB, Escueta S, Schanzer A, Farhadi S, Metz T, Zeyda M, Möslinger D, Greber-Platzer S, Konstantopoulou V. Demethylation of the promoter region of *GPX3* in a newborn with classical phenylketonuria. *Clin Biochem*. 2017; 50(3): 159-61.
- Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011; 2(6): 607-17.
- Judes G, Rifai K, Ngollo M, Daures M, Bignon YJ, Penault-Llorca F, Bernard-Gallon D. A bivalent role of TIP60 histone acetyl transferase in human cancer. *Epigenomics*. 2015; 7(8): 1351-63.
- Karkashon S, Raghupathy R, Bhatia H, Dutta A, Hess S, Higgs J, Tifft CJ, Little JA. Intermediaries of branched chain amino acid metabolism induce fetal hemoglobin, and repress *SOX6* and *BCL11A*, in definitive erythroid cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2015; 55(2): 161-7.
- Kemper JK, Choi SE, Kim DH. Sirtuin 1 deacetylase: a key regulator of hepatic lipid metabolism. *Vitam Horm*. 2013; 91: 385-404.
- Khemir S, Halayem S, Azzouz H, Siala H, Ferchichi M, Guedria A, Bedoui A, Abdelhak S, Messaoud T, Tebib N, Belhaj A, Kaabachi N. Autism in phenylketonuria patients: from clinical presentation to molecular defects. *J Child Neurol*. 2016; 31(7): 843-9.
- Knudsen GM, Hasselbalch S, Toft PB, Christensen E, Paulson OB, Lou H. Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*. 1995; 18(6): 653-64.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128(4): 693-705.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet*. 2010; 70: 27-56.
- Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*. 2010; 11(3): 191-203.
- Landvogt C, Mengel E, Bartenstein P, Buchholz HG, Schreckenberger M, Siessmeier T, Scheurich A, Feldmann R, Weglage J, Cumming P, Zepp F, Ullrich K. Reduced cerebral fluoro-L-dopamine uptake in adult

- patients suffering from phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28(4): 824-31.
- Lappas M. Anti-inflammatory properties of sirtuin 6 in human umbilical vein endothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 597514.
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(3): 204-20.
- Lee HS, Ka SO, Lee SM, Lee SI, Park JW, Park BH. Overexpression of sirtuin 6 suppresses inflammatory responses and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(7): 1776-85.
- Li D, Gu X, Lu L, Liang L. Effects of phenylalanine on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: possible involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Biochem.* 2010; 339(1-2): 1-7.
- Li L, Jin C, Ye L, Shao G, Wang L, Lin M. Argininosuccinate synthetase gene is silenced by CpG methylation in children with phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2013; 46(18): 1793-7.
- Li Y, Seto E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016; 6(10). pii: a026831.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009; 462(7271): 315-22.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.
- Lu L, Gu X, Li D, Liang L, Zhao Z, Gao J. Mechanisms regulating superoxide generation in experimental models of phenylketonuria: an essential role of NADPH oxidase. *Mol Genet Metab.* 2011; 104(3): 241-8.
- Maksin-Matveev A, Kanfi Y, Hochhauser E, Isak A, Cohen HY, Shainberg A. Sirtuin 6 protects the heart from hypoxic damage. *Exp Cell Res.* 2015; 330(1): 81-90.
- Malyuchenko NV, Kotova EY, Kulaeva OI, Kirpichnikov MP, Studitskiy VM. PARP1 inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae.* 2015; 7(3): 27-37.
- Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R, Nava Rodrigues D, Robinson D, Omlin A, Tunariu N, Boysen G, Porta N, Flohr P, Gillman A, Figueiredo I, Paulding C, Seed G, Jain S, Ralph C, Protheroe A, Hussain S, Jones R, Elliott T, McGovern U, Bianchini

- D, Goodall J, Zafeiriou Z, Williamson CT, Ferraldeschi R, Riisnaes R, Ebbs B, Fowler G, Roda D, Yuan W, Wu YM, Cao X, Brough R, Pemberton H, A'Hern R, Swain A, Kunju LP, Eeles R, Attard G, Lord CJ, Ashworth A, Rubin MA, Knudsen KE, Feng FY, Chinnaiyan AM, Hall E, de Bono JS. DNA-Repair Defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373(18): 1697-708.
- Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, Jacques CE, Dalazen G, Cortes MX, Coelho J, Dutra-Filho CS. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis*. 2011; 26(4): 291-7.
- McDonald JD, Charlton CK. Characterization of mutations at the mouse phenylalanine hydroxylase locus. *Genomics*. 1997; 39(3): 402-5.
- McKean CM, Boggs DE, Peterson NA. The influence of high phenylalanine and tyrosine on the concentrations of essential amino acids in brain. *J Neurochem*. 1968; 15(3): 235-41.
- Miteva YV, Cristea IM. A proteomic perspective of Sirtuin 6 (SIRT6) phosphorylation and interactions and their dependence on its catalytic activity. *Mol Cell Proteomics*. 2014; 13(1): 168-83.
- Moraes TB, Dalazen GR, Jacques CE, de Freitas RS, Rosa AP, Dutra-Filho CS. Glutathione metabolism enzymes in brain and liver of hyperphenylalaninemic rats and the effect of lipoic acid treatment. *Metab Brain Dis*. 2014; 29(3): 609-15.
- Moraes TB, Jacques CE, Rosa AP, Dalazen GR, Terra M, Coelho JG, Dutra-Filho CS. Role of catalase and superoxide dismutase activities on oxidative stress in the brain of a phenylketonuria animal model and the effect of lipoic acid. *Cell Mol Neurobiol*. 2013; 33(2): 253-60.
- Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2014; 24(1): 15-28.
- Muck JS, Kandasamy K, Englmann A, Günther M, Zink D. Perinuclear positioning of the inactive human cystic fibrosis gene depends on CTCF, A-type lamins and an active histone deacetylase. *J Cell Biochem*. 2012; 113(8): 2607-21.
- Murphy BC, Scriver CR, Singh SM. CpG methylation accounts for a recurrent mutation (c.1222C>T) in the human *PAH* gene. *Hum Mutat*. 2006; 27(9): 975.
- National Institutes of Health (US). National Center for Biotechnology Information (NCBI). United States National Library of Medicine. Epigenomics Scientific Background. Epigenomics Help [Internet]. Bethesda: NCBI; 2011.

- Ney DM, Blank RD, Hansen KE. Advances in the nutritional and pharmacological management of phenylketonuria. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014; 17(1): 61-8.
- Nieratschker V, Batra A, Fallgatter AJ. Genetics and epigenetics of alcohol dependence. *J Mol Psychiatry*. 2013; 1(1): 11.
- Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*. 2012; 92(3): 1479-514.
- Nunes AK, Wachholz RG, Rover MR, Souza LC. Prevalence of disorders detected by newborn screening in Santa Catarina. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013; 57(5): 360-7.
- O'Neill CA, Eisensmith RC, Croke DT, Naughten ER, Cahalane SF, Woo SL. Molecular analysis of PKU in Ireland. *Acta Paediatr Suppl*. 1994; 407: 43-4.
- Ogino H, Nakayama R, Sakamoto H, Yoshida T, Sugimura T, Masutani M. Analysis of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) gene alteration in human germ cell tumor cell lines. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010; 197(1): 8-15.
- Okano Y, Nagasaka H. Optimal serum phenylalanine for adult patients with phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2013; 110(4): 424-30.
- Ossovskaya V, Koo IC, Kaldjian EP, Alvares C, Sherman BM. Upregulation of poly (ADP-Ribose) polymerase-1 (PARP1) in triple-negative breast cancer and other primary human tumor types. *Genes Cancer*. 2010; 1(8): 812-21.
- Ounap K, Lilleväli H, Metspalu A, Lipping-Sitska M. Development of the phenylketonuria screening programme in Estonia. *J Med Screen*. 1998; 5(1): 22-3.
- Ozalp I, Coşkun T, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, Tokol S, Köksal G, Özgüç M, Köse R. Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future. *Turk J Pediatr*. 2001; 43(2): 97-101.
- Paino F, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G, De Rosa A, Laino L, Altucci L, Papaccio G. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells*. 2014; 32(1): 279-89.
- Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(6): 1039-56.
- Pascucci T, Giacobuzzo G, Andolina D, Accoto A, Fiori E, Ventura R, Orsini C, Conversi D, Carducci C, Leuzzi V, Puglisi-Allegra S.

- Behavioral and neurochemical characterization of new mouse model of hyperphenylalaninemia. *PLoS One*. 2013; 8(12): e84697.
- Penrose L, Quastel JH. Metabolic studies in phenylketonuria. *Biochem J*. 1937; 31(2): 266-74.
- Pérez-Dueñas B, Pujol J, Soriano-Mas C, Ortiz H, Artuch R, Vilaseca MA, Campistol J. Global and regional volume changes in the brains of patients with phenylketonuria. *Neurology*. 2006; 66(7): 1074-8.
- Pfaendner NH, Reuner G, Pietz J, Jost G, Rating D, Magnotta VA, Mohr A, Kress B, Sartor K, Hähnel S. MR imaging-based volumetry in patients with early-treated phenylketonuria. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005; 26(7): 1681-5.
- Pitt JJ. Newborn screening. *Clin Biochem Rev*. 2010; 31(2): 57-68.
- Rahnasto-Rilla M, Lahtela-Kakkonen M, Moaddel R. Sirtuin 6 (SIRT6) activity assays. In: Sarkar S, editor. *Histone Deacetylases*. Nova Iorque: Springer New York; 2016.
- Regier DS, Greene CL. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, editores. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): Universidade de Washington; 2016.
- Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. L-Carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene*. 2014; 533(2): 469-76.
- Robert M, Rocha JC, van Rijn M, Ahring K, Bélanger-Quintana A, MacDonald A, Dokoupil K, Gokmen Ozel H, Lammardo AM, Goyens P, Feillet F. Micronutrient status in phenylketonuria. *Mol Genet Metab*. 2013; 110 Supl: S6-17.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T, Leiros I. DNA repair in mammalian cells: base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(6): 981-93.
- Rocha JC, MacDonald A, Trefz F. Is overweight an issue in phenylketonuria? *Mol Genet Metab*. 2013; 110 Supl: S18-24.
- Rocha JC, Martins MJ. Oxidative stress in phenylketonuria: future directions. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35(3): 381-98.
- Sarasin A, Dessen P. DNA repair pathways and human metastatic malignant melanoma. *Curr Mol Med*. 2010; 10(4): 413-8.
- Saunderson EA, Spiers H, Mifsud KR, Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Shaikh A, Mill J, Reul JM. Stress-induced gene expression and behavior are controlled by DNA methylation and methyl donor availability in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(17): 4830-5.
- Schmoll M, Dattenböck C, Carreras-Villaseñor N, Mendoza-Mendoza A, Tisch D, Alemán MI, Baker SE, Brown C, Cervantes-Badillo MG,

- Cetz-Chel J, Cristobal-Mondragon GR, Delaye L, Esquivel-Naranjo EU, Frischmann A, Gallardo-Negrete Jde J, García-Esquivel M, Gomez-Rodriguez EY, Greenwood DR, Hernández-Oñate M, Kruszewska JS, Lawry R, Mora-Montes HM, Muñoz-Centeno T, Nieto-Jacobo MF, Nogueira Lopez G, Olmedo-Monfil V, Osorio-Concepcion M, Pilsyk S, Pomraning KR, Rodriguez-Iglesias A, Rosales-Saavedra MT, Sánchez-Arreguín JA, Seidl-Seiboth V, Stewart A, Uresti-Rivera EE, Wang CL, Wang TF, Zeilinger S, Casas-Flores S, Herrera-Estrella A. The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *trichoderma* species. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80(1): 205-327.
- Schwer B, Schumacher B, Lombard DB, Xiao C, Kurtev MV, Gao J, Schneider JI, Chai H, Bronson RT, Tsai LH, Deng CX, Alt FW. Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(50): 21790-4.
- Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007; 76: 75-100.
- Sharma S, Taliyan R. Histone deacetylase inhibitors: future therapeutics for insulin resistance and type 2 diabetes. *Pharmacol Res.* 2016; 113(Pt A): 320-26.
- Sheng K, Liang X, Huang S, Xu W. The role of histone ubiquitination during spermatogenesis. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 870695.
- Schulpis KH, Tsakiris S, Traeger-Synodinos J, Papassotiriou I. Low total antioxidant status is implicated with high 8-hydroxy-2-deoxyguanosine serum concentrations in phenylketonuria. *Clin Biochem.* 2005; 38(3): 239-42.
- Simon KR, Dos Santos RM, Scaini G, Leffa DD, Damiani AP, Furlanetto CB, Machado JL, Cararo JH, Macan TP, Streck EL, Ferreira GC, Andrade VM, Schuck PF. DNA damage induced by phenylalanine and its analogue *p*-chlorophenylalanine in blood and brain of rats subjected to a model of hyperphenylalaninemia. *Biochem Cell Biol.* 2013; 91(5): 319-24.
- Singh J, Khan M, Singh I. HDAC inhibitor SAHA normalizes the levels of VLCFAs in human skin fibroblasts from X-ALD patients and downregulates the expression of proinflammatory cytokines in *Abcd1/2*-silenced mouse astrocytes. *J Lipid Res.* 2011; 52(11): 2056-69.
- Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. L-Carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 2009a; 29(2): 211-8.
- Sitta A, Manfredini V, Biasi L, Treméa R, Schwartz IV, Wajner M, Vargas CR. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine

- blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutat Res.* 2009b; 679(1-2): 13-6.
- Sitta A, Vanzin CS, Biancini GB, Manfredini V, de Oliveira AB, Wayhs CA, Ribas GO, Giugliani L, Schwartz IV, Bohrer D, Garcia SC, Wajner M, Vargas CR. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol.* 2011; 31(3): 429-36.
- Somaraju UR, Merrin M. Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015; 3: CD008005.
- Sperner-Unterweger B, Kohl C, Fuchs D. Immune changes and neurotransmitters: possible interactions in depression? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014 3; 48: 268-76.
- Stefanska B, MacEwan DJ. Epigenetics and pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2015; 172(11): 2701-4.
- Steliou K, Boosalis MS, Perrine SP, Sangerman J, Faller DV. Butyrate histone deacetylase inhibitors. *Biores Open Access.* 2012; 1(4): 192-8.
- Stevenson M, McNaughton N. A comparison of phenylketonuria with attention deficit hyperactivity disorder: do markedly different aetiologies deliver common phenotypes? *Brain Res Bull.* 2013; 99: 63-83.
- Strisciuglio P, Concolino D. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites.* 2014; 4(4): 1007-17.
- Su J, Wang F, Cai Y, Jin J. The functional analysis of histone acetyltransferase MOF in tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(1). pii: E99.
- Sulzyc-Bielicka V, Domagala P, Hybiak J, Majewicz-Broda A, Safranow K, Domagala W. Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. *Pol J Pathol.* 2012; 63(2): 87-92.
- Sun WJ, Zhou X, Zheng JH, Lu MD, Nie JY, Yang XJ, Zheng ZQ. Histone acetyltransferases and deacetylases: molecular and clinical implications to gastrointestinal carcinogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2012; 44(1): 80-91.
- Sutivijit Y, Banpavichit A, Wiwanitkit V. Prevalence of neonatal hypothyroidism and phenylketonuria in Southern Thailand: A 10-year report. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011; 15(2): 115-17.
- Thandavarayan RA, Garikipati VN, Joladarashi D, Suresh Babu S, Jeyabal P, Verma SK, Mackie AR, Khan M, Arumugam S, Watanabe K, Kishore R, Krishnamurthy P. Sirtuin-6 deficiency exacerbates diabetes-induced impairment of wound healing. *Exp Dermatol.* 2015; 24(10): 773-8.

- van Beekum O, Kalkhoven E. Aberrant forms of histone acetyltransferases in human disease. *Subcell Biochem.* 2007; 41: 233-62.
- van Dijk M, Thulluru HK, Mulders J, Michel OJ, Poutsma A, Windhorst S, Kleiverda G, Sie D, Lachmeijer AM, Oudejans CB. HELLIP babies link a novel lincRNA to the trophoblast cell cycle. *J Clin Invest.* 2012; 122(11): 4003-11.
- Vyas S, Chesarone-Cataldo M, Todorova T, Huang YH, Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun.* 2013; 4: 2240.
- Waddington CH. The pupal contraction as an epigenetic crisis in *Drosophila*. *Proc Zool Soc Lond.* 1942; A111(3-4): 181-89.
- Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics.* 2016; 8: 59.
- Weglage J, Fromm J, van Teeffelen-Heithoff A, Möller HE, Koletzko B, Marquardt T, Rutsch F, Feldmann R. Neurocognitive functioning in adults with phenylketonuria: results of a long term study. *Mol Genet Metab.* 2013; 110 Suppl: S44-8.
- Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect.* 2006; 114(3): A160-7.
- Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29(1): 31-41.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004; 339(1-2): 1-9.
- Wu Y, Chen L, Wang Y, Li W, Lin Y, Yu D, Zhang L, Li F, Pan Z. Overexpression of Sirtuin 6 suppresses cellular senescence and NF- κ B mediated inflammatory responses in osteoarthritis development. *Sci Rep.* 2015; 5: 17602.
- Wu Y, Hou F, Wang X, Kong Q, Han X, Bai B. Aberrant expression of histone deacetylases 4 in cognitive disorders: molecular mechanisms and a potential target. *Front Mol Neurosci.* 2016; 9: 114. eCollection 2016.
- Wyse AT, Sarkis JJ, Cunha-Filho JS, Teixeira MV, Schetinger MR, Wajner M, Wannmacher CM. ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from cerebral cortex of rats subjected to chemically induced phenylketonuria. *Braz J Med Biol Res.* 1995; 28(6): 643-9.
- Xiong X, Wang G, Tao R, Wu P, Kono T, Li K, Ding WX, Tong X, Tersey SA, Harris RA, Mirmira RG, Evans-Molina C, Dong XC. Sirtuin

- 6 regulates glucose-stimulated insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2016; 59(1): 151-60.
- Yamagata Y, Szabó P, Szüts D, Bacquet C, Arányi T, Páldi A. Rapid turnover of DNA methylation in human cells. *Epigenetics*. 2012; 7(2): 141-5.
- You M, Jogasuria A, Taylor C, Wu J. Sirtuin 1 signaling and alcoholic fatty liver disease. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015; 4(2): 88-100.
- Yu SS, Cai Y, Ye JT, Pi RB, Chen SR, Liu PQ, Shen XY, Ji Y. Sirtuin 6 protects cardiomyocytes from hypertrophy *in vitro* via inhibition of NF- κ B-dependent transcriptional activity. *Br J Pharmacol*. 2013; 168(1): 117-28.
- Zhang Y, Gu X, Yuan X. Phenylalanine activates the mitochondria-mediated apoptosis through the RhoA/Rho-associated kinase pathway in cortical neurons. *Eur J Neurosci*. 2007; 25(5): 1341-8.
- Zhang C, Zhong JF, Stucky A, Chen XL, Press MF, Zhang X. Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics*. 2015; 7: 117.
- Zhong Q, Kowluru RA. Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2011; 60(4): 1304-13.
- Zhongshu Z, Weiming Y, Yukio F, Cheng-LNing Z, Zhixing W. Clinical analysis of West syndrome associated with phenylketonuria. *Brain Dev*. 2001; 23(7): 552-7.

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 66/2012

Professor:

PATRICIA FERNANDA SCHUCK

Título: "MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA FENILCETONÚRIA: ESTUDO DOS EFEITOS *IN VITRO* E *EX VIVO* DA FENILALANINA"

"STUDY OF THE PATHOPHYSIOLOGY OF PHENYLKETONURIA: *IN VITRO* AND *EX VIVO* EFFECTS OF PHENYLALANINE"

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA.
www.unesc.net/propex/ceua

Criciúma, 18 de maio de 2012.

Alexandra Ioppi Zugno

Coordenadora Adjunta da CEUA

**ANEXO B - Adendo do Parecer da Comissão de Ética no Uso de
Animais**



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o adendo abaixo.

Protocolo: AD-66/2012

Professor Responsável: Patrícia Fernanda Schuck.

Título: "MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DA FENILCETONÚRIA: ESTUDO DOS EFEITOS *IN VITRO* E *EX VIVO* DA FENILALANINA"

Este adendo foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização 438 ratos Wistar. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma, 3 de abril de 2014

VILSON HEINZEN CARDOSO
Coordenador Adjunto da CEUA